

DIE BEDEUTUNG VON INTERLEUKIN-37 (IL-37) BEI DER DURCH
STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE INDUZIERTEN LUNGENENTZÜNDUNG SOWIE
DER PROGRESSION IN EINE SEPSIS

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Anja Erika Schauer (geb. Reinhardt)
geboren am 21.06.1981 in Sondershausen

Gutachter

1. Prof. Dr. med. Hortense Slevogt, Jena
2. PD Dr. Kerstin Voigt, Jena
3. Prof. Dr. med. Ulrike Seifert, Greifswald

Tag der öffentlichen Verteidigung: 04.12.2018

Inhaltsverzeichnis

1 Abkürzungsverzeichnis

2 Zusammenfassung

3 Einleitung

3.1 *S. pneumoniae*

3.2 Klinisches Bild und Pathogenese der Pneumokokken-Pneumonie

3.3 Sepsis

3.4 Pulmonale Immunmechanismen

3.5 Interleukin-37

3.5.1 Genorganisation, Expression und Prozessierung von IL-37

3.5.2 Wirkungsmechanismus von IL-37

3.5.3 Transgene Expression des humanen IL-37b

4 Ziele der Arbeit

5 Material und Methodik

5.1 Material

5.1.1 Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme

5.1.2 Medien

5.1.3 Chemikalien und Reagenzien

5.1.4 Puffer, Lösungen, Gele

5.1.5 Primer

5.1.6 Antikörper

5.1.7 Im Tierversuch eingesetzte Medikamente

5.1.8 Kommerziell erhältliche Kits

5.1.9 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Laborutensilien, Software

5.2 Methoden

5.2.1 Tierexperimente

5.2.2 Zellkultur

5.2.3 Mikrobiologisches Arbeiten

5.2.4 Molekularbiologische Methoden

5.2.5 Immunologische Nachweismethoden

5.2.6 Statistik

6 **Ergebnisse**

6.1 Das Expressionsprofil von IL-37 in RAW-Zellen und dessen Auswirkungen auf die induzierte Immunantwort nach Stimulation mit *S. pneumoniae*

6.1.1 *S. pneumoniae* induziert die Expression von IL-37 mRNA in RAW-Zellen

6.1.2 Das IL-37 Protein akkumuliert im Zellkern und im Zytosol der RAW-Zellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae*

6.1.3 Die Phagozytose-Rate von *S. pneumoniae* durch RAW-Zellen bleibt durch IL-37 unbeeinflusst, während die intrazelluläre Eliminierung der Pneumokokken eingeschränkt ist

6.1.4 IL-37 reprimiert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

6.2 IL-37 wird als Folge einer Infektion mit *S. pneumoniae* in IL-37-tg-Mäusen exprimiert und sekretiert

6.3 Untersuchung der Bedeutung von IL-37 im Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie

6.3.1 IL-37tg-Mäuse zeigen eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu den WT-Mäusen

6.3.2 IL-37tg-Mäuse weisen eine erhöhte Bakterienlast in Lunge, BAL und Blut auf

6.3.3 Die transgene Expression von IL-37 beeinflusst das Expressionsmuster pro-inflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie

6.3.4 IL-37tg-Mäuse zeigen in der BAL eine verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen

6.3.5 Die transgene Expression von IL-37 hat massive Gewebeschäden der Lunge mit übermäßigem Absterben von neutrophilen Granulozyten und vermehrtem Pneumokokkenbefall zur Folge

7 **Diskussion**

7.1 Der Einfluss von *S. pneumoniae* auf die Expression von IL-37 *in vitro* und *in vivo*

7.2 *In vitro*-Studien mit *S. pneumoniae* am Modell der stabil transfizierten Mausemakrophagen-Zelllinie RAW 264.7

7.2.1 Der Einfluss von IL-37 auf die durch *S. pneumoniae* induzierte Immunantwort

7.3 Die Bedeutung von IL-37 in der Pneumokokken-Pneumonie durch *in vivo*-Studien an einem IL-37tg Mausmodell

7.3.1 IL-37tg-Mäuse zeigen eine erhöhte Sterblichkeit sowie eine stärkere bakterielle Belastung von Lunge, BAL und Blut im Vergleich zu den WT-Mäusen

7.3.2 Der Einfluss von IL-37 auf das Expressionsmuster pro-inflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie

7.3.3 IL-37tg-Mäuse zeigen in der BAL eine verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen

7.3.4 Histopathologische und immunhistochemische Beurteilung von infizierten Lungenschnitten bei IL-37tg- und WT-Mäusen

8 **Schlussfolgerung**

9 **Literatur- und Quellenverzeichnis**

10 **Anhang**

10.1 *Score-Sheet* zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes der Versuchstiere

10.2 Repräsentative Bilder der Diff-Quik-Färbung

10.3 Danksagung

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

1 Abkürzungsverzeichnis

Ab-MLV	Abelson-Maus-Leukämievirus
A. dest	Destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua destillata</i>)
ARDS	engl.: <i>acute respiratory distress syndrome</i>
bp	Basenpaare
BAL	Bronchoalveoläre Lavage
BSA	Bovines Serum Albumin
CAP	engl.: <i>community-acquired pneumonia</i>
CCL-2	engl.: <i>CC-chemokine ligand-2</i>
cDNA	engl.: <i>copy DNA</i>
CFU	Kolonie-bildende Einheit (engl.: <i>colony forming units</i>)
CpG	Zusammenschluss von zwei Nukleotiden, welche die Nukleobasen Cytosin bzw. Guanin aufweisen
CT	Zyklus-Schwellenwert (engl.: <i>Cycle threshold</i>)

DIC	engl.: <i>differential interference contrast</i>
DMEM	engl.: <i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Dinukleotidtriphosphate
DPBS	Dulbeccos Phosphat gepufferte Salzlösung
DMSO	Dimethylsulfoxid
ECMV	engl.: <i>encephalomyocarditis virus</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest (engl.: <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FBS	Fetales Rinderserum (engl.: <i>fetal bovine serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
G-CSF	engl.: <i>granulocyte-colony stimulating factor</i>
HAP	engl.: <i>hospital-acquired pneumonia</i>
HBSM	HEPES-gepufferte Salzlösung mit Magnesium (engl.: <i>HEPES buffered saline with magnesium</i>)
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HRP	Meerrettich Peroxidase (engl.: <i>horse raddish peroxidase</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
IL	Interleukin
IRES	engl.: <i>internal ribosome entry site</i>
kDa	Kilo-Dalton
LD90	letale Dosis, deren letaler Effekt sich auf 90 Prozent der beobachteten Population bezieht
LPS	Lipopolysaccharid
LytA	Autolysin A
MALP-2	engl.: <i>macrophage-activating lipopeptide-2</i>
MCP-1	engl.: <i>monocyte chemoattractant protein-1</i>

MOI	Multiplizität der Infektion (engl.: <i>multiplicity of infection</i>)
mRNA	Boten RNA (engl.: <i>messenger RNA</i>)
OD	Optische Dichte
PAMPs	engl.: <i>pathogen associated molecular patterns</i>
PBMC	engl.: <i>peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphate buffered saline</i>)
PCMV-IE	engl.: <i>constitutively active cytomegalievirus immediate early promotor</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PRR	engl.: <i>pattern recognition receptor</i>
PspA	engl.: <i>pneumococcal surface protein</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase/ Reverse Transkription
RT-	Negativkontrolle in der RT zur Kontrolle des DNA-Verdaus während der RNA-Reinigung
shRNA	engl.: <i>small hairpin RNA</i>
siRNA	engl.: <i>small interfering RNA</i>
SIRS	engl.: <i>systemic inflammatory response syndrome</i>
SPF	engl.: <i>specific pathogen free</i>
TGF- β	engl.: <i>transforming growth factor-β</i>
THY	<i>Todd Hewitt Yeast</i>
TIR	engl.: <i>Toll-IL-1-resistance domain</i>
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
Tris	2-Amino-2(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
WT	Wildtyp

2 Zusammenfassung

Die ambulant erworbene Pneumonie (engl.: *community-acquired pneumonia* [CAP]) ist die häufigste, weltweit diagnostizierte Infektionskrankheit. In ca. 30-50 % aller Fälle wird dabei *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*) als ursächlicher Erreger identifiziert. Die Pneumokokken-Pneumonie ist für 70% der Todesfälle der CAP verantwortlich. Eine schwere Komplikation der Pneumokokken-Pneumonie ist die invasive Pneumokokken-Infektion, die eine Sepsis mit septischem Schock, Multiorganversagen und Tod zur Folge haben kann. Das Krankheitsbild der Sepsis zeichnet sich dabei u.a. durch eine Dysregulation pro- und anti-inflammatorischer Immunreaktionen aus, welches ein sog. „*host defense failure*“ nach sich zieht.

Interleukin-37 (IL-37) ist Mitglied der IL-1 Genfamilie und wird innerhalb dieser Gruppe den anti-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet. In zahlreichen Studien konnte IL-37 ein immunsupprimierender Effekt bei entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen nachgewiesen werden, wodurch Schäden für den Organismus nachweislich abgemildert wurden. Wie IL-37 in die Immunabwehr bei Erreger-induzierten Infektionen involviert ist, wurde bisher für *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Listeria monocytogenes* untersucht. Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die Bedeutung von IL-37 im Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie und der Progression in eine Sepsis zu analysieren.

Die in dieser Arbeit bearbeiteten Fragestellungen wurden sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Da bis heute kein Gen-Homolog von IL-37 in der Maus identifiziert werden konnte, stützen sich alle, in dieser Arbeit generierten Ergebnisse, auf ein IL-37-transgenes Mausmodell sowie auf stabil transfizierte Mausmakrophagen (RAW 264.7), denen die komplette Gensequenz des humanen *IL37b* mittels des pIRES Expressionsvektors eingebracht wurde.

Anhand der *in vitro*-Daten konnte gezeigt werden, dass die Expression von IL-37 durch eine Stimulation der stabil transfizierten RAW-Zellen mit *S. pneumoniae* induziert wird. Als unmittelbare Folge reguliert IL-37 die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β herunter. Zudem führt IL-37 in den RAW-Zellen zu einer

Verminderung der Fähigkeit, aufgenommene Pneumokokken intrazellulär abzutöten. Die *in vivo* am IL-37tg Mausmodell induzierte Pneumokokken-Pneumonie brachte das Resultat, dass eine Infektion mit Pneumokokken sowohl bei den WT- als auch bei den IL-37tg-Mäusen zu einer systemischen Infektion führt, wobei IL-37 die körpereigene Abwehr negativ zu beeinflussen scheint, was zu einer erhöhten Letalität führt. Die IL-37tg-Mäuse zeigten eine erhöhte bakterielle Belastung im Lungengewebe und in der Bronchoalveolären Lavage (BAL), begleitet von einem massiven Einstrom von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Lunge. Zudem zeichneten sich im Vergleich zu dem Lungengewebe von WT-Mäusen verstärkt nekrotische Bereiche im Lungenparenchym der IL-37tg-Mäuse ab. Bei der Analyse der Expression und Sekretion ausgewählter pro-inflammatorischer Zytokine und Chemokine konnte ein biphasisches Muster beobachtet werden. In der frühen Phase der Infektion zeigte sich in Lunge und Blut der IL-37tg-Mäuse eine Reduktion der pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren, während im weiteren Verlauf bei den IL-37tg-Mäusen zu einem starken Anstieg der pro-inflammatorischen Immunreaktionen kam.

Insgesamt lassen die Ergebnisse dieser Arbeit den Schluss zu, dass IL-37 für den Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Pneumonie nachteilig zu sein scheint. Die während der frühen Phase der Infektion durch IL-37 induzierte Suppression pro-inflammatorischer Entzündungsreaktionen führt zu einer erheblichen Steigerung der Ausbreitung der Erreger. Dadurch wird ein sekundärer pro-inflammatorischer Prozess in Gang gesetzt, der das klinische Bild einer nekrotisierenden Pneumonie zur Folge hat und zu einer höheren Sterblichkeit führt.

3 Einleitung

Infektionen des Respirationstraktes zählen weltweit nach wie vor zu den häufigsten Infektionskrankheiten. Dabei spielt die ambulant erworbene Pneumonie (engl.: *community-acquired pneumonia* [CAP]) eine bedeutende Rolle. Darunter versteht man eine akute mikrobielle Infektion des Lungenparenchyms, die außerhalb des Krankenhauses oder während der ersten 48 h nach Aufnahme im Krankenhaus erworben wurde. Sie ist die häufigste, weltweit registrierte Infektionskrankheit, wobei *Streptococcus pneumoniae* (*S. pneumoniae*, auch Pneumokokken genannt) in ca. 30-50% der Fälle als Auslöser der Pneumonie identifiziert wird und somit den wichtigsten Erreger der CAP darstellt (Welte 2009). Davon abzugrenzen ist die nosokomial, das heißt im Krankenhaus erworbene Pneumonie (engl.: *hospital-acquired pneumonia* [HAP]). Sie gehört zu den häufigsten im Rahmen eines Krankenhausaufenthaltes auftretenden Infektionen und entwickelt sich definitionsgemäß frühestens 48-72 h nach Hospitalisierung (Ewig et al. 2010). Ambulant erworbene Pneumonien haben meist eine gute Prognose. Die nosokomialen Lungenentzündungen bedürfen von Beginn an einer aggressiveren Behandlung.

Weltweit sterben jährlich etwa 1,6 Millionen Menschen an einer durch *S. pneumoniae* verursachten Infektion, weit mehr als die Hälfte davon sind Kinder unter 5 Jahren, die meist aus Entwicklungsländern stammen (WHO 2007).

Aber auch in industriell hochentwickelten Gebieten wie Europa und den USA werden circa 30% der ambulant erworbenen Pneumonien von *S. pneumoniae* verursacht, wobei die Sterblichkeitsrate zwischen 10% und 30% liegt (WHO, 2005). Allein in Deutschland beträgt die Inzidenz der CAP 3,7-10,1 pro 1000 Einwohner, was in etwa 400.000-680.000 Behandlungsfällen pro Jahr entspricht und nach Schätzungen zufolge 4000-8000 Todesfälle nach sich zieht (Welte 2009).

Angeichts der steigenden Zahl von antibiotikaresistenten Pneumokokken-Stämmen und bislang fehlender Therapie-Alternativen nimmt die Bedeutung von *S. pneumoniae* stetig zu (Nuorti et al. 1998, Schrag et al. 2001, McCullers et al. 2000, Tan 2003). So müssen neben der Suche nach wirksamen Antibiotika auch neue, Antibiotika-unabhängige Strategien zur Behandlung von invasiven Pneumokokken-Infektionen entwickelt werden.

3.1 *S. pneumoniae*

S. pneumoniae gehört zur Gattung *Streptococcus* innerhalb der Familie der *Streptococcaceae* und ist ein extrazelluläres, humanpathogenes, grampositives Bakterium, das sowohl leichte Infektionen als auch schwer verlaufende Erkrankungen wie Pneumonie,

Hirnhautentzündung und Sepsis hervorrufen kann (van der Poll und Opal 2009, Lozano et al. 2012). Die ovalen bis lanzettförmigen Kokken kommen meist als Pärchen (Diplokokken) oder in kurzen Ketten vor. Sie sind nicht motil (ohne aktive Bewegung), katalase-negativ und zählen zu den α -hämolisierenden Streptokokken, was sich während der Kultivierung auf Blutagar durch einen grünen Hämolysehof zeigt (Musher 2009).

Pneumokokken synthetisieren eine Vielzahl von Pathogenitätsfaktoren, u.a. Hyaluronsäure, Neuraminidase A/B, *pneumococcal surface protein A* (PspA), *pneumococcal surface adhesin A* (PsaA), Polysaccharidkapsel, Autolysin A (LytA) und das Endotoxin Pneumolysin (Henriques-Normark und Tuomanen 2013). Da die Virulenz von *S. pneumoniae* von dessen Ausprägung der Polysaccharidkapsel abhängt, kommt dieser besondere Bedeutung als Pathogenitätsfaktor zu. Sie erschwert die Opsonierung des Erregers durch das alternative Komplementsystem sowie die Phagozytose durch polymorphonukleäre Leukozyten (Kadioglu et al. 2008). Des Weiteren sind sowohl die chemische Struktur, als auch die Dicke der Kapsel entscheidend für den Übergang vom symptomlosen Trägerstadium in das invasive Infektionsstadium. Dabei sind bekapselte Stämme um das 10^5 -fache virulenter als die unbekapselten Serotypen. Die Kapselstärke des Erregers wird erst bei enger Interaktion oder Invasion von Wirtszellen reduziert. (Hammerschmidt et al. 2005, AlonsoDeVelasco et al. 1995, Watson und Musher 1990). Fast alle klinisch relevanten Pneumokokken-Stämme sind bekapselt. Klassifiziert nach den Antigeneigenschaften der Kapselpolysaccharide, sind aktuell 97 Pneumokokken Serotypen bekannt (Geno et al. 2015). Dabei sind die Serotypen 1, 2, 3, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23 hochgradig virulent (Tuomanen et al. 1995, Sandgren et al. 2005, Rodgers et al. 2009). Auch das Pneumolysin gilt als wichtiger Pathogenitätsfaktor. Das Pneumokokken-Toxin kommt in allen klinisch relevanten Pneumokokken-Stämmen vor. Vom Bakterium freigesetzt führt es zur Schädigung von Phagozyten und Epithelzellen und in hohen Konzentrationen zur pulmonalen Vasokonstriktion (Witzenrath et al. 2006).

3.2 Klinisches Bild und Pathogenese der Pneumokokken-Pneumonie

Das natürliche Habitat der Pneumokokken ist der menschliche Nasopharynx (Nasenrachenraum), wo sie zur transienten Standortflora gehören. Dort besiedeln sie als Kommensale zumeist symptomlos die Schleimhäute. Dabei liegt die Trägerrate bei Kindern bei 60%, bei Erwachsenen zwischen 40-50%. Meist findet man aber eine Mischflora aus verschiedenen Serotypen von *S. pneumoniae* vor (Dockrell et al. 2012, Austrian 1986, Bogaert et al. 2004). Die Besiedelung durch Pneumokokken muss nicht zwangsläufig zu

einer Erkrankung führen. Meistens dauert eine Kolonisation Wochen bis Monate an, und wird durch das angeborene (innate) sowie erworbene (adaptive) Immunsystem kontrolliert (van der Poll und Opal 2009). Dennoch kann der harmlose Kommensale des Nasopharynx Auslöser schwerer invasiver Erkrankungen sein.

Obwohl eine Pneumokokken-Infektion in jedem Alter auftreten kann, besitzen Kinder (< 2. Lebensjahr) und ältere Menschen (> 65. Lebensjahr) sowie abwehrgeschwächte oder unter chronischen Erkrankungen leidende Personen ein erhöhtes Risiko, eine lebensbedrohliche Infektion zu entwickeln (Garenne et al. 1992, Nuorti et al. 2000, Costa et al. 2004, Naveau und Houssiau 2005, de Bruyn et al. 2004). Zudem treten Pneumokokken-Infektionen oft als Sekundärinfektionen nach vorausgegangenen viralen Infekten des oberen Respirationstraktes auf (Benner et al. 1974, Seki et al. 2004, Kukavica-Ibrulj et al. 2009). Die invasiven Infekte gehen meist von der eigenen Flora des Nasopharynx aus, können aber auch durch Übertragung der Erreger von einer kolonisierten Person beim Husten, Niesen oder Sprechen induziert sein. Hierbei kann eine Infektion mit *S. pneumoniae* klinisch unterschiedlich manifestiert sein. Zunächst beginnt eine Infektion mit der Adhärenz von

S. pneumoniae an die Epithelzellen des Nasopharynx. Dies erfolgt meist durch Pneumokokken vom sogenannten transparentem Phänotyp. Sie exprimieren weniger Kapselpolysaccharid, sodass die adhäsiven Oberflächenmoleküle der Bakterien für die Anheftung an Epithelzellen zugänglich sind (Hammerschmidt et al. 2005). Nach der Besiedlung der Nasennebenhöhlen kann *S. pneumoniae* über die Eustachische Röhre in das Mittelohr gelangen und typische, lokale Infektionen wie Nasennebenhöhlenentzündungen (Sinusitis) und Mittelohrentzündungen (Otitis Media) auslösen (Lynch und Zhanel 2010, O'Brien KL 2009). Kommt es zu einer Störung der Homöostase zwischen Wirt und Erreger, können die Pneumokokken aus dem Nasopharynx in die Lunge disseminieren. Dort schützt die Polysaccharidkapsel die Bakterien vor der Phagozytose und Zerstörung durch alveoläre Makrophagen, so dass sich der Erreger dort ausbreiten kann und sich eine Pneumonie entwickelt (Loda et al. 1975, Boulnois 1992, Ekdahl et al. 1997). Infektionen der Lunge sind durch plötzlich auftretendes Fieber, das von respiratorischen Symptomen wie Husten, Auswurf und Kurzatmigkeit begleitet wird, geprägt (Welte 2009). Als schwere Komplikation einer Pneumokokken-Pneumonie ist die Bakteriämie zu sehen, die in einer Sepsis resultieren kann. Bei bis zu 25% aller Pneumokokken-Pneumonien erfolgt eine Dissemination der Bakterien in den Blutstrom.

Etwa 30% der Sepsis-Patienten entwickeln ein „acute respiratory distress syndrome“ (ARDS), was durch eine akute, lebensbedrohliche Lungenschädigung gekennzeichnet ist und bei einem Drittel durch eine Pneumonie verursacht wird (Matthay und Zemans 2011,

Rubenfeld und Herridge 2007). Histopathologisch findet sich dabei in der akuten Phase der bakteriell bedingten Lungenparenchymschädigung zunächst eine diffuse Infiltration der Alveolen mit neutrophilen Granulozyten. Zudem zeichnen sich Atelektasen (unbelüftete, kollabierte Areale) und ein nichtkardiogenes Lungenödem ab (Matthay et al. 2012, Force et al. 2012). Da die Sepsis eine schwere Komplikation der Pneumokokken-Pneumonie darstellt, soll im Folgenden näher darauf eingegangen werden.

3.3 Sepsis

Sepsis ist eine komplexe und systemische Wirtsreaktion, die in der Regel auf eine Infektion durch Bakterien oder andere Mikroorganismen zurückzuführen ist. In vielen Fällen nimmt sie dabei ihren Ursprung in der Lunge (Winning et al. 2006). Misslingt es dem Wirtsorganismus, die Krankheitserreger auf einen begrenzten Bezirk zu beschränken, gelangen diese in die Blutbahn und können eine Sepsis bis hin zum septischen Schock mit Multiorganversagen und Todesfolge auslösen.

Aktuell ist die Sepsis definiert als eine lebensbedrohliche Organdysfunktion, hervorgerufen durch eine gestörte Immunantwort des Wirtsorganismus auf die Infektion. (Singer et al. 2016). Charakterisiert wird eine Sepsis durch das Vorliegen eines „*systemic inflammatory response-syndrome*“ (SIRS), das anhand von mindestens zwei der folgenden Kriterien nachgewiesen wurde: Hypo- oder Hyperthermie (Unterkühlung oder Überwärmung), Tachykardie (erhöhte Herzfrequenz), Tachypnoe (erhöhte Atemfrequenz) und Leukozytose oder Leukopenie (erhöhte oder verringerte Leukozyten) (Hagel et al. 2013). Die Definition der schweren Sepsis ist an das Vorliegen von Organdysfunktionen geknüpft (schwere Sepsis = Infektion + SIRS + Organdysfunktionen). Der septische Schock zeichnet sich als Sepsis plus eine therapieresistente Hypotension oder Hypoperfusion (Abnahme des messbaren Blutflusses) trotz adäquater Flüssigkeitstherapie aus (Dellinger et al. 2008).

Als frühzeitige Reaktion auf eine Infektion werden die Erreger durch Rezeptoren des angeborenen Immunsystems erkannt, was die Aktivierung einer pro-inflammatorischen Immunantwort zur Folge hat. Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind auf vielen Körperzellen wie z.B. auf Makrophagen, Monozyten, Granulozyten und natürlichen Killerzellen sowie auch auf Endothel- und Epithelzellen vorhanden. Diese Zellen erkennen Pathogene mithilfe spezieller Rezeptoren, deren Interaktionen dann über intrazelluläre Signalkaskaden zur Zellaktivierung und somit zur Freisetzung von Botenstoffen wie Zytokinen, Chemokinen und antimikrobiellen Mediatoren führen. Die Freisetzung dieser

Substanzen erfordert vom Organismus eine fein abgestimmte Regulation, um einerseits die Bekämpfung des Pathogens zu gewährleisten, andererseits aber ein Überschießen der Immunreaktion und den damit verbundenen Schäden für den Organismus zu verhindern. Eine Sepsis ist dadurch gekennzeichnet, dass die körpereigene Regulationskapazität des Organismus versagt („*host defense failure*“). Im Detail bedeutet das, dass die Stimulation von Körper- und Immunzellen, ausgelöst durch das Pathogen, zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF κ B und somit zur Freisetzung von pro-inflammatorischen Mediatoren wie TNF- α , IL-1 β und IL-6 führt. Adhäsionsmoleküle werden hochreguliert und es bilden sich zudem Sauerstoffradikale (Bohrer et al. 1997, Takeuchi und Akira 2010). Darüber hinaus kann es zu einer pathologischen Aktivierung des Gerinnungssystems kommen, welches wiederum zur Induktion pro-inflammatorischer Effekte führen kann.

Im fortgeschrittenen Stadium der Sepsis kommt es dann zu einer Dysregulation der einzelnen Komponenten des Immunsystems, was zu einer Phase der relativen Immunsuppression führt. In dieser Phase werden exzessiv anti-inflammatorische Mediatoren wie IL-10, IL-4 und der IL-1 Rezeptor Antagonist freigesetzt, was zu einer ungenügenden Infektabwehr führt. Gewebeschädigung und Multiorganversagen mit Todesfolge können daraus resultieren (Hotchkiss und Karl 2003).

3.4 Pulmonale Immunmechanismen

Die frühe pulmonale Immunantwort ist für die Abwehr von eindringenden Partikeln und die Regulierung der Entzündungsreaktion wichtig (Seeley et al. 2012). Dabei beruht die Effektivität der Erregerabwehr auf der komplexen Zusammenarbeit der unterschiedlichen Komponenten des Immunsystems. Denn die Abwehrreaktionen selbst, insbesondere unkontrollierte Reaktionen können pulmonale Dysfunktionen bedingen oder deren Entstehung fördern.

Die erste Verteidigungslinie gegen eindringende pathogene Mikroorganismen stellt das pulmonale Epithel dar. Es bildet eine Grenzfläche zwischen dem inneren Milieu des menschlichen Organismus und der Umwelt. (Bals und Hiemstra 2004, Gomez und Prince 2008). Es ermöglicht eine mukoziliäre Reinigung, indem zilienträgende Zellen und schleimproduzierende Becherzellen den kontinuierlichen Transport von Sekreten und Fremdmaterial wie z. B. Bakterien aus den Lungen in die oberen Atemwege gewährleisten (Hippenstiel et al. 2006, Mayer und Dalpke 2007).

Teile des angeborenen und erworbenen Immunsystems bilden die zweite und dritte Abwehrreihe gegen eindringende Erreger (Opitz et al. 2010). Einer der wichtigsten Komponenten des körpereigenen Abwehrsystems im Respirationstrakt sind eine Reihe verschiedener transmembraner und intrazellulärer Muster-Erkennungsrezeptoren (engl.:

pattern recognition receptors), die PRRs. Von den PRRs werden hoch-konservierte Moleküle des Keimes, sogenannte PAMPs (engl.: *pathogen associated molecular patterns*) als wirtsfremd erkannt. Zu den PAMPs zählen vor allem Lipopolysaccharid (LPS) und Peptidoglykan von Bakterien, Mannan von Pilzen sowie bakterielle DNA und Doppelstrang-RNA von verschiedenen Viren (Kawai und Akira 2010, Mizgerd 2008, Paterson und Mitchell 2006). Die PRRs lassen sich nach Vorkommen, Aufbau, Liganden und Signalwegen in verschiedene Gruppen einteilen. Zu ihnen gehören die RIG-I-ähnlichen Rezeptoren (RLRs), die NOD-like-Rezeptoren (NLRs) sowie die *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs) (Opitz et al. 2010). Eine wichtige Gruppe sind die TLRs. Sie befinden sich sowohl extrazellulär (TLR1, -2, -3, TLR4-6, -10), als auch intrazellulär (TLR3, TLR7-9) und werden durch zahlreiche pulmonale Zellen exprimiert. So besitzen Alveolarmakrophagen TLR1, -2, -4, -6, -7, -8 (Maris et al. 2006) und Lungenepithelzellen TLR1-6 und TLR9 (Greene und McElvaney 2005, Mayer et al. 2007). In Lungenendothelzellen konnten TLR2, -4 und -8 nachgewiesen werden (Fan et al. 2003, Li et al. 2004). TLRs erkennen unterschiedliche Bakterienbestandteile und spielen vor allem bei der Infektion mit Pneumokokken eine wichtige Rolle (Abbildung 1). Dabei werden Bestandteile von *S. pneumoniae* wie Peptidoglykan (PG) und Teichonsäure über TLR-2 (Yoshimura et al. 1999, Means et al. 1999), nicht methylierte CpGs (als Bestandteile der bakteriellen Desoxyribonukleinsäure) über TLR-9 (Hemmi et al. 2000) und Pneumolysin (möglicherweise) über TLR-4 erkannt (Calbo und Garau 2010, Malley et al. 2003). Folglich wird eine intrazelluläre Signalkaskade zur Produktion inflammatorischer Zytokine, Interferone und Chemokine ausgelöst (Bals und Hiemstra 2004, Hippenstiel et al. 2006, Mizgerd 2008, Paterson und Mitchell 2006, Kato und Schleimer 2007). Mit Hilfe dieser Mediatoren werden andere Zellen des Immunsystems aktiviert und phagozytierende Zellen, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen, rekrutiert. Dabei sind vor allem die neutrophilen Granulozyten in ihrer Funktion, den Erreger durch Phagozytose zu eradizieren, von Bedeutung (Gomez und Prince 2008). Die intakte Immunantwort ist von essentieller Bedeutung, um die bakterielle Infektion einzudämmen. Denn eine andauernde und unkontrollierte Immunantwort kann zu einer pulmonalen Gewebsschädigung führen (Matthay et al. 2012, Mizgerd 2008).

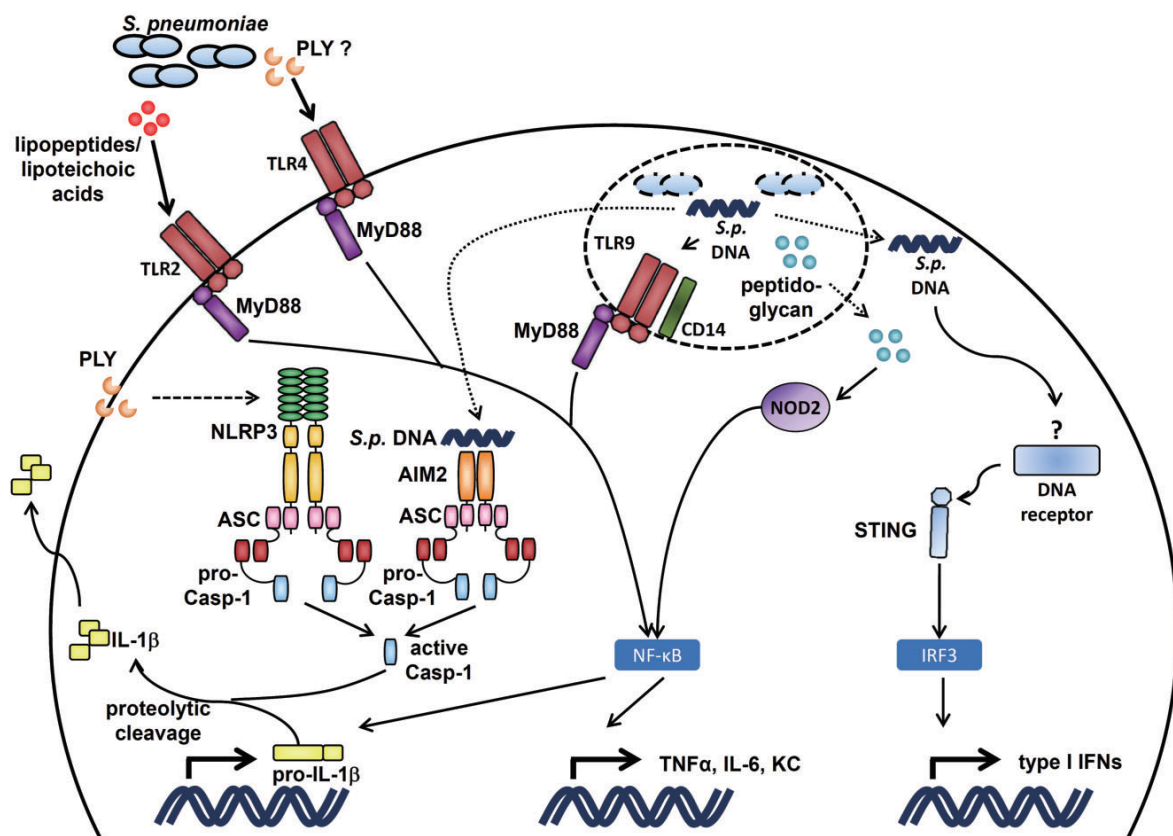


Abbildung 1: Überblick über die TLR's, die an der Erkennung von *S. pneumoniae* und den damit vermittelten Signalwegen beteiligt sind. Die Darstellung wurde aus (Koppe et al. 2012) entnommen.

3.5 Interleukin-37

Das humane Interleukin-37 (IL-37) wurde im Jahr 2000 von drei unabhängigen Forschungsgruppen entdeckt und erstmals beschrieben (Kumar et al. 2000, Busfield et al. 2000, Smith et al. 2000). Zahlreiche Forschungsarbeiten über die bedeutende Rolle von IL-37 bezüglich beobachteter anti-inflammatorischer und immunmodulatorischer Effekte auf das angeborene und erworbene Immunsystem wurden seitdem publiziert. So konnte im Jahr 2011 zum ersten Mal die immunsupprimierende Funktion von IL-37 adressiert werden.

Bei Stimulationsversuchen von Maus-Makrophagen sowie humanen Makrophagen mit den TLR-Liganden LPS und *macrophage-activating lipopeptide-2* (MALP-2) zeigte sich eine Reduktion der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und damit verbunden eine Supprimierung der angeborenen und erworbenen Immunität. Desweiteren konnte im Mausmodell nachgewiesen werden, dass die transgene Expression von humanem IL-37 einem LPS-induzierten, endotoxinen Schock vorbeugt (Nold et al. 2010).

Diese Entdeckung lieferte neue Therapieansätze für etliche Erkrankungen, weshalb der Einfluß von IL-37 bei einer Vielzahl von entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen untersucht wurde. So dämmt IL-37 unter anderem das entzündliche Geschehen bei der Schuppenflechte (Psoriasis), der rheumatoiden Arthritis sowie dem systemischen Lupus erythematoses nachweislich ein (Teng et al. 2014, Ye et al. 2015a, Ye et al. 2014a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-37 das Krankheitsgeschehen bei Vorliegen einer hepatischen Ischämie, einem metabolischen Syndrom, einer Colitis sowie der Aortenklappenverkalkung abmildert (McNamee et al. 2011, Sakai et al. 2012, Ballak et al. 2014, Zeng et al. 2017). Auch auf das Geschehen nach einer Rückenmarkverletzung und einem Herzinfarkt sowie bei Asthma und Arteriosklerose übt

IL-37 eine positive Funktion aus (Lunding et al. 2015, Xu et al. 2015, Wu et al. 2013, Coll-Miro et al. 2016). Zudem liegen auch Studien zur Rolle von IL-37 bei durch Mikroorganismen hervorgerufene Infektionen vor. In einem murinen Infektionsmodell mit *Aspergillus fumigatus* hatte die Behandlung der Mäuse mit rekombinanten IL-37 eine verminderte Schädigung des Lungengewebes zur Folge. Dabei konnte das Verhindern der Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms mit Reduzierung der IL-1 β Sekretion nachgewiesen werden (Moretti et al. 2014). Weiterhin zeigten Mäuse, die humanes IL-37 transgen exprimieren, eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber einer Infektion mit *Candida albicans* (van de Veerdonk et al. 2014). Bei Tuberkulosepatienten, hervorgerufen durch *Mycobacterium tuberculosis*, konnte nachgewiesen werden, dass IL-37 die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine inhibiert und die Phagozytoseleistung der Makrophagen steigert (Huang et al. 2015). Zudem führte eine durch *Listeria monocytogenes* hervorgerufene Infektion in Mäusen zu einer deutlich erhöhten Bakterienlast sowie massiven Leberschäden, wenn die Tiere zuvor mit rekombinanten IL-37 behandelt wurden (Zhao et al. 2017). Da bis heute kein Gen-Homolog von IL-37 in der Maus identifiziert werden konnte, basieren alle bislang veröffentlichten Studien auf IL-37-transgenen Zell- bzw. Mausmodellen, humanem Patientenmaterial oder Versuchen mit humanem rekombinanten IL-37 (Dinarello et al. 2016).

3.5.1 Genorganisation, Expression und Prozessierung von IL-37

Nach der Entdeckung des humanen IL-37 konnte es durch Vergleiche mit bekannten mRNA- Transkripten der *Expressed Sequence Tags*-Datenbank (EST) der IL-1F Genfamilie zugeordnet werden. Ursprünglich als IL-1F7 bezeichnet, befindet sich der Genlocus von *IL37*, wie bei den meisten Mitgliedern der IL-1F Familie auf Chromosom 2q12-13. Die Ausnahme bilden *IL18* und *IL33*, die auf anderen Chromosomen lokalisiert sind (Busfield et al. 2000, Smith et al. 2000, Boraschi et al. 2011). Die IL-1F Familie umfasst eine Gruppe von Proteinen, die eine Schlüsselrolle bei der Vermittlung der Aktivierung des angeborenen Immunsystems spielen. Dabei üben IL-1 β , IL-1 α , IL-33, IL-18, IL-36 α , IL-36 β , IL-36 γ eine pro-inflammatorische Funktion aus, IL-10, IL-37, IL-36Ra, IL-1 Rezeptor Antagonist fördern dagegen anti-inflammatorische Immunreaktionen (Dinarello 2013, Boraschi et al. 2011). In der Maus befindet sich das *IL1F* Gen-Cluster ebenfalls auf Chromosom 2 (Boraschi et al. 2011). Abbildung 2 zeigt die Genomorganisation des humanen und des murinen *IL1F* Locus im Vergleich. Beide sind, bezüglich der Anordnung und Orientierung der *IL1F* Gene, hoch konserviert und identisch. Die Ausnahme bildet *IL1F7*. Es ist in der Maus nicht vorhanden und bis heute konnte keine Gensequenz gefunden werden, die mit dem humanen *IL1F7* bzw. *IL37* Gen übereinstimmt.

Durch alternatives Spleißen, wodurch die Introns (nicht codierende Abschnitte) entfernt werden, entstehen 5 verschiedene Isoformen. *IL37a-e* (Abbildung 3). Dabei ist *IL37b* mit 5 von 6 Exons die längste und am besten charakterisierte Isoform. Im gesunden Gewebe sowie in ruhenden, unstimulierten humanen Monozyten wird IL-37b nur in geringen Mengen exprimiert, sodass das *steady state* Level an IL-37 mRNA sehr niedrig ist. Nach der Stimulierung von humanen Monozyten mit LPS, erhöht sich die mRNA Stabilität, was zur Prozessierung des Proteins führt. Erklären lässt sich das durch das Vorhandensein von „Instabilitäts-Elementen“ in Exon 5, wodurch die mRNA in ruhenden, unstimulierten Zellen rasch abgebaut wird (Boraschi et al. 2011, Bufler et al. 2004). In peripheren, mononukleären Blutzellen (PBMC = *peripheral blood mononuclear cell*) sowie in dendritischen Zellen kann die IL-37-Expression durch die TLR-Liganden LPS, Pam₃CSK₄, TGF- β ₁, IL-18, IFN- γ , IL-1 β , TNF, CpG induziert werden (Pan et al. 2001).

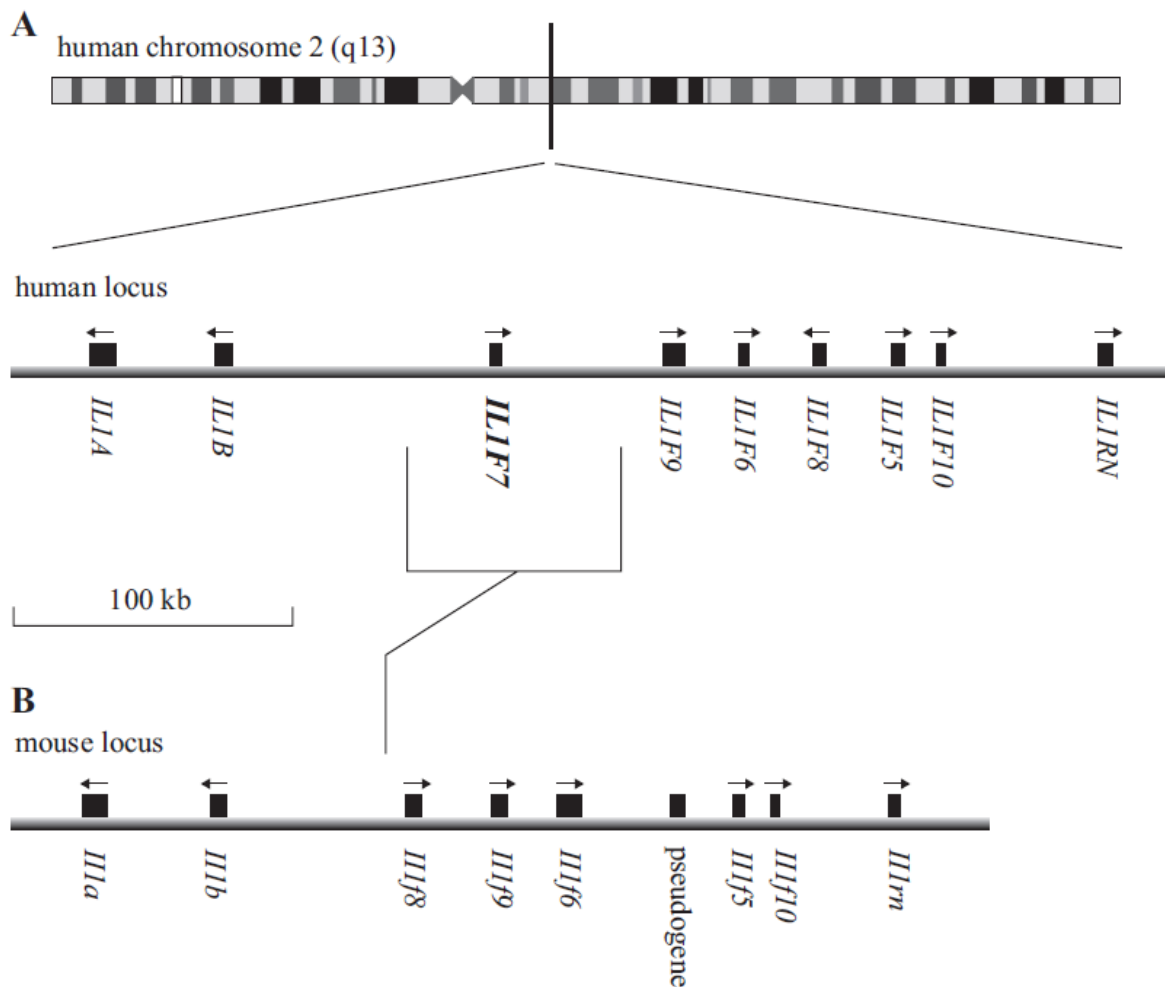


Abbildung 2: Genomorganisation des humanen und des murinen *IL1F* Locus im Vergleich

(A) Humanes *IL1F* Gen-Cluster. (B) *IL1F* Gen-Cluster der Maus. Die Darstellung wurde aus (Boraschi et al. 2011) entnommen.

Charakteristisch für die Zytokine der IL-1 Familie ist, dass sie zumeist als unreifes Propeptid gebildet werden und erst durch eine post-translationale Modifikation in ihre aktive Form überführt werden. Die Caspase-1 ist dabei das verantwortliche Enzym für die Reifung der IL-1 Vorläuferproteine und den Transport der aktiven Zytokine aus der Zelle, insbesondere für IL-1 β und IL-18 (Keller et al. 2008). Auch IL-37 wird über ein unreifes Vorläuferprotein durch die Caspase-1 prozessiert. Innerhalb des Exon 1 befindet sich ein Genabschnitt, der für die Caspase-1 kodiert. Diese Spaltstelle für Caspase-1 in Exon 1 ist bei den Isoformen b, c d und e vorhanden (Sharma et al. 2008, Kumar et al. 2002).

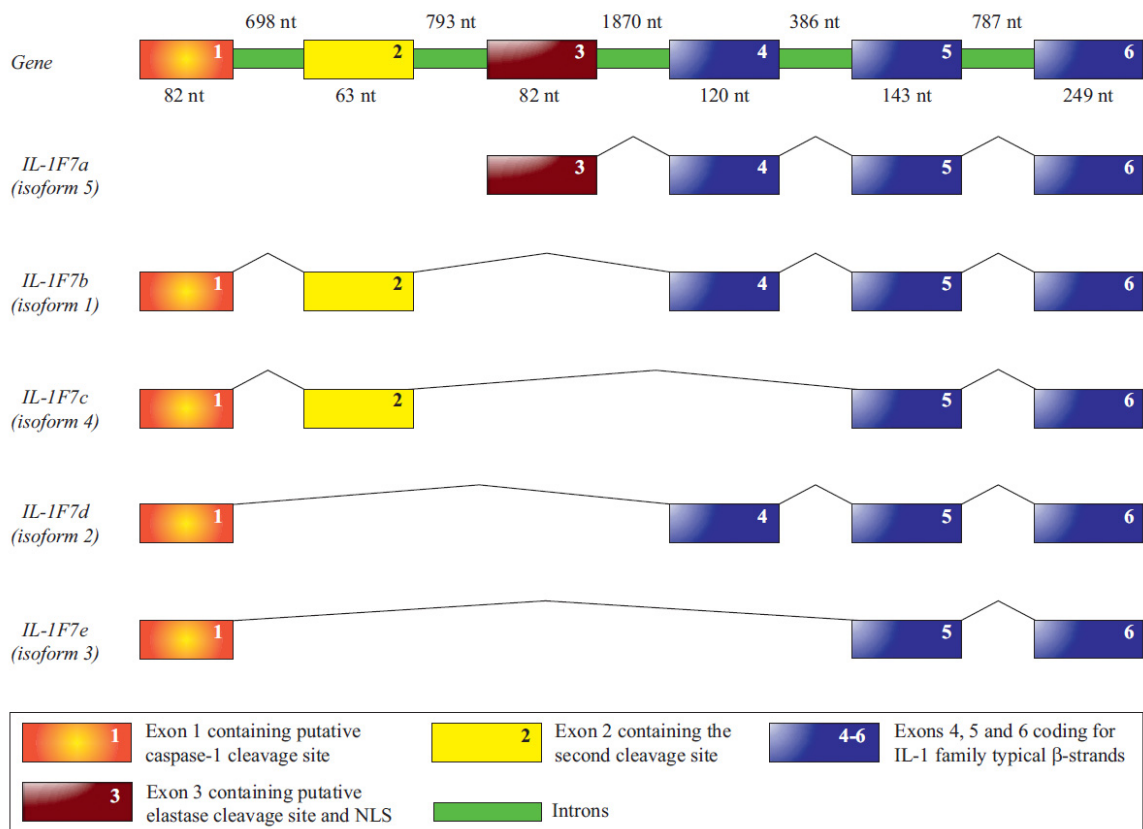


Abbildung 3: Exon-Intron-Struktur des humanen *IL1F7* Genes

Die Darstellung wurde aus (Boraschi et al. 2011) entnommen.

IL-37 wird in einer Vielzahl gesunder humaner Gewebe exprimiert. Unter anderem in peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs), Gewebsmakrophagen, Synovialzellen, tonsillären B-Zellen, Plasmazellen, neoplastischen Zellen, epithelialen Hautzellen, Niere, Hoden, Uterus, Thymus, Intestinum, Lunge, Milz, Prostata, Herz, Leber und Bauchspeicheldrüse (Boraschi et al. 2011). Dabei konnten erhöhte Konzentrationen von IL-37 mit einer Reihe von Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Es sind aber auch verringerte IL-37 Konzentrationen mit bestimmten Erkrankungen assoziiert (Tabelle 1).

Tabelle 1: Zusammenhang von erhöhten bzw. verringerten IL-37 Proteinkonzentration mit bestimmten Krankheiten.

erhöhte IL-37 Proteinkonzentration	verringerte IL-37 Proteinkonzentration
akutes Koronarsyndrom (Chai et al. 2015, Al Shahi et al. 2015, Wang et	Psoriasis (Muhr et al. 2011)

al. 2015, Chai et al. 2017)	
rheumatoide Arthritis (Zhao et al. 2014b, Yang et al. 2015, Xia et al. 2015, Chai et al. 2015, Ye et al. 2015a)	Adipositas mit bestehender Insulinresistenz (Ballak et al. 2014)
hepatozelluläres Karzinom (Zhao et al. 2014a)	Parodontose (Saglam et al. 2015)
Morbus Basedow (Li et al. 2014)	Nasenpolypen (Cheng et al. 2014)
Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (Di Stefano et al. 2014)	allergische Rhinitis (Heuschnupfen) (Liu et al. 2014)
Hepatitis B, Hepatitis C (Li et al. 2013b)	Asthma (Charrad et al. 2016)
Systemischer Lupus Erythematoses (Song et al. 2013, Ye et al. 2014a)	granulomatöse Panuveitis (Ye et al. 2015b)
Chronisch-entzündliche Darmerkrankung (Imaeda et al. 2013, Weidlich et al. 2014, Abbate et al. 2014, Gunaltay et al. 2014)	Morbus Behçet (Ye et al. 2014b, Bouali et al. 2015)
atopische Dermatitis (Jartti et al. 2014, Fujita et al. 2013)	nicht-kleinzelliges Lungenkarzinom (Ge et al. 2016)
Guillain-Barré-Syndrom (Li et al. 2013a)	
Morbus Bechterew (Ge et al. 2011)	
Psoriasis (Teng et al. 2014)	
HIV-1 (Hojen et al. 2015)	
Chronische Herzinsuffizienz (Shou et al. 2017)	

3.5.2 Wirkungsmechanismus von IL-37

Frühere Studien haben gezeigt, dass IL-37 an die alpha-Kette des IL-18 Rezeptors (IL-18R α) bindet, was zu der Annahme führte, dass IL-37 als Rezeptor-Antagonist für IL-18 fungiert (Pan et al. 2001, Kumar et al. 2002). Jedoch haben Bindestudien ergeben, dass IL-37 nur eine sehr schwache Affinität zu IL-18R α besitzt, was der Hypothese widerspricht, dass IL-37 ein Rezeptor-Antagonist von IL-18R ist. Vielmehr konnte bewiesen werden, dass IL-37 über die Bildung eines dreigliedrigen Komplexes, durch die Bindung an IL-18R α und Rekrutierung des Orphanrezeptors IL-1R8, seine anti-inflammatorische Wirkung erzielt (Nold-Petry et al. 2015, Li et al. 2015). IL-18R besitzt, wie alle Mitglieder der IL-1R Familie, sogenannte TIR- Domänen (engl.: *toll-IL-1-resistance domain*). Bei der normalen Signalkaskade bindet IL-18 an IL-18R α , wodurch IL-18R β rekrutiert wird und die TIR-Domänen von IL-1R α und IL-1R β dimerisieren. Das Adapterprotein MyD88 bindet folglich an die TIR-Domänen und löst über die Aktivierung von Proteinkinasen ein starkes, pro-inflammatorisches Signal aus (Abbildung 4A). Bindet hingegen IL-37 an IL-18R α Kette des IL-18R, wird anstatt der IL-18R β Kette der Orphanrezeptor IL-1R8 rekrutiert. Die TIRb-Domäne von IL-1R8 ist mutiert. Folglich führt die anschließende Bindung von MyD88 an die TIRb-Domäne von

IL-1R8 zu einem schwachen bzw. keinem pro-inflammatorischen Signal (Abbildung 4B) (Dinarello et al. 2016, Gong et al. 2010). Zahlreiche Studien in IL-37tg Mäusen belegen die Hypothese des dreigliedrigen Komplexes aus IL-37-IL-18R α -IL-1R8. Während die transgene Expression von IL-37 in Mäusen vor einem LPS-induzierten Endotoxinschock schützt (Nold et al. 2010), war dies in IL-37tg Mäusen, die einen Defekt des IL-1R8 Genes aufweisen, nicht gegeben (Nold-Petry et al. 2015). Zudem ist die anti-inflammatorische Wirkung von IL-37 bei der akuten Lungenschädigung durch *Aspergillus fumigatus*, der entzündlichen Arthritis sowie dem Asthma an das Vorhandensein von IL-1R8 geknüpft, was in verschiedenen Mausmodellen nachgewiesen werden konnte (Moretti et al. 2014, Lunding et al. 2015).

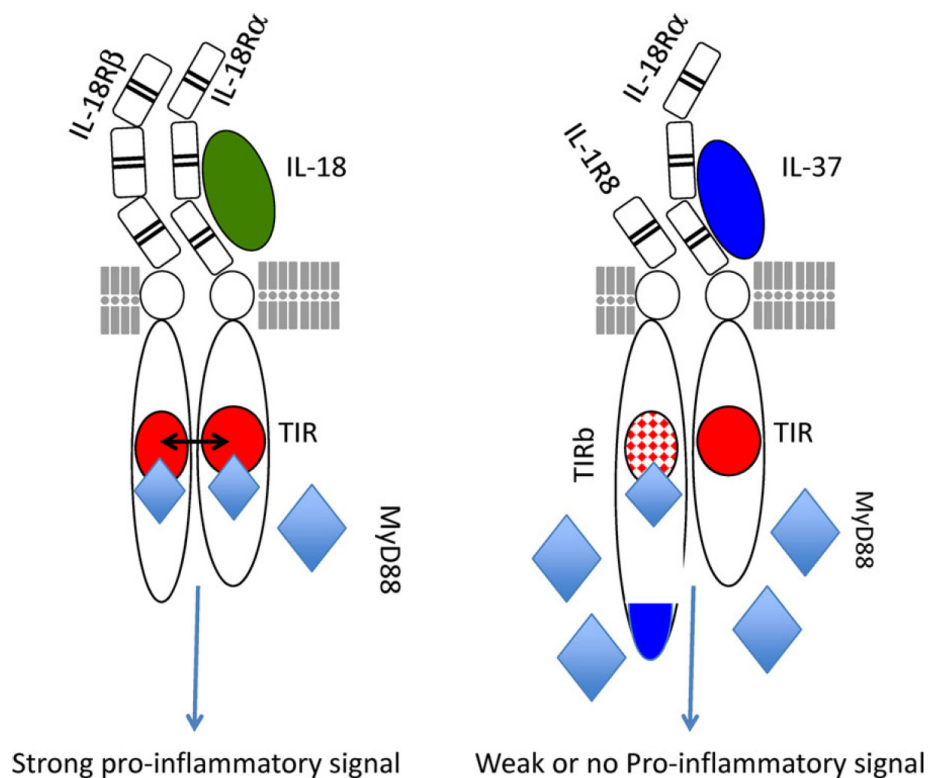


Abbildung 4: Vergleich der Bindung von IL-18 und IL-37 an die IL-18R α Kette des IL-18 Rezeptors (A) normale Signalkaskade der IL-18R-vermittelten Immunantwort durch Bindung von IL-18 an IL-18R α . (B) veränderte Signalkaskade der IL-18R-vermittelten Immunantwort durch Bindung von IL-37 an IL-18R α und die damit verbundene Rekrutierung des Orphanrezeptors IL-1R8. Die Darstellung wurde aus (Dinarello et al. 2016) entnommen.

IL-37 interagiert auch mit dem IL-18-Bindeprotein (IL-18BP), indem es mit IL-18BP einen Komplex bildet. Dieser wiederum rekrutiert die IL-18R β -Kette des IL-18 Rezeptors und

unterbindet so die Aktivierung des IL-18 Signalweges. So zeigte die Stimulation von humanen NK-4-Zellen mit IL-18, bei gleichzeitiger Zugabe von IL-37 und IL-18BP eine Verringerung der IFN- γ Konzentration (Bufler et al. 2002). Des Weiteren wurde durch auf proteomischen Analysen basierende Untersuchungen nachgewiesen, dass IL-37 mit Smad3 interagiert (Grimsby et al. 2004). Smad3 ist ein Mitglied der SMAD-Proteinfamilie, deren Mitglieder wesentliche Komponenten des TGF β -abhängigen Signalweges darstellen (Heldin et al. 1997, Attisano und Wrana 1998, Massague 1998, Attisano und Wrana 2002, Whitman 1998, Wrana 2000). *In vitro*-Versuche mit A549 Zellen, die stabil das humane IL-37 exprimieren, zeigten, dass IL-37 und Smad3 einen funktionellen Komplex bilden und sich in ihrer Funktion gegenseitig bedingen. Zudem wird die IL-37-vermittelte Inhibierung von IL-6 durch einen spezifischen Smad3-Inhibitor aufgehoben. Auch der Abbau von Smad3 durch lentivirale shRNA (engl.: *small hairpin RNA*) bzw. siRNA (engl.: *small interfering RNA*) blockierte die immunsupprimierende Fähigkeit von IL-37 *in vitro* und *in vivo* (Nold et al. 2010).

Basierend auf diesen unterschiedlichen Ansätzen des Wirkungsprinzips von IL-37 wird die Hypothese verfolgt, dass IL-37 sowohl intrazellulär als auch extrazellulär aktiv ist und demnach eine Doppelfunktion als „*dual function*“ Zytokin einnimmt. Abbildung 5 gibt einen Überblick über die Doppelfunktion von IL-37. Es ist bekannt, dass das Vorläuferprotein von IL-37 nach Stimulation von humanen PBMCs intrazellulär akkumuliert und nach Aktivierung von Caspase-1 in den Zellkern wandert wo es die Expression pro-inflammatorischer Zytokine herunterreguliert (Sharma et al. 2008, Bulau et al. 2014). Man geht dabei davon aus, dass die Carboxyl-Domäne des aktiven IL-37 an Smad3 bindet und dieser Komplex dann in den Zellkern wandert, wo er die Transkription verschiedener inflammatorischer Gene inhibiert (Abbildung 5A). Für diese Hypothese gibt es aber bis heute keinen konkreten Beweis. Abbildung 5B zeigt den extrazellulären Einfluss von IL-37 über den bereits beschriebenen IL-37/IL-18R α /IL-1R8-Komplex. In welchem Maße intrazelluläres oder extrazelluläres IL-37 für die Suppression der Immunantwort in IL-37tg- Mäusen verantwortlich ist, bleibt aber ungeklärt.

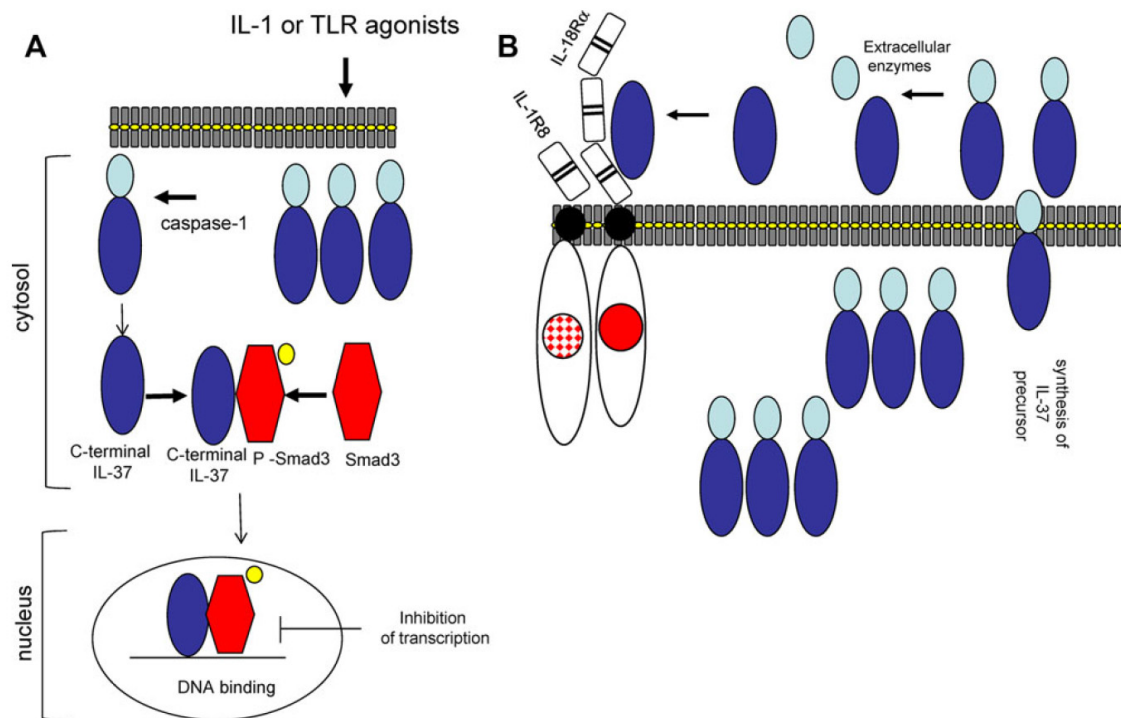


Abbildung 5: Darstellung der IL-37-Doppelfunktion als „dual function“ Zytokin

(A) Intrazelluläre Funktion von IL-37 über Bildung eines aktiven Komplexes mit Smad3 und Translokation des Komplexes in den Zellkern, wo er die Expression inflammatorischer Gene inhibiert. (B) Extrazelluläre Funktion von IL-37 über die Bindung an IL-18R α . Die Darstellung wurde aus (Dinarello et al. 2016) entnommen.

3.5.3 Transgene Expression des humanen IL-37b

Ein Organismus wird als transgen bezeichnet, wenn in dessen Genom ein Gen einer anderen Spezies integriert wurde. Der Gentransfer erfolgt dabei über die Artengrenze hinweg. Die erste genetisch modifizierte Maus wurde 1974 von Rudolf Jaenisch vorgestellt. Dabei brachte man die DNA-Sequenz des Simian-Virus 40 in einen Mausembryo ein. Nach der Geburt zeigte sich, dass das Gen in allen Zellen exprimiert wird. Damals war der Erfolg aber dadurch limitiert, dass das eingebrachte Gen nicht auf die Nachkommen übertragen wurde (Jaenisch und Mintz 1974). Die Weitergabe des Transgens auf die Nachkommen konnte erstmals 1981 von drei Gruppen erfolgreich gezeigt werden (Gordon und Ruddle 1981, Brinster et al. 1981, Costantini und Lacy 1981).

Genetisch modifizierte Mäuse finden heute eine bedeutende Anwendung bei der Erforschung einer Vielzahl humaner Erkrankungen. Dabei eignen sich Mäuse besonders gut, da ihr Genom zu 80% dem des Menschen entspricht, weshalb Gewebe und Organe der Maus denen des Menschen sehr ähnlich sind (Cho et al. 2009). Transgene Mausmodelle

werden dabei als ideal betrachtet, um molekulare Mechanismen von Genprodukten und ihre Interaktionen in zellulären Prozessen zu beschreiben.

In der Maus wurde bis heute keine homologe Gensequenz zum humanen IL-37 gefunden (Dinarello et al. 2016). Deshalb stützen sich alle, in dieser Arbeit generierten Ergebnisse, auf ein IL-37-transgenes Mausmodell sowie auf stabil transfizierte Mausmakrophagen, denen die komplette Gensequenz des humanen *IL37b* mittels des pIRES-Expressionsvektors eingebracht wurde (Nold et al. 2010). Abbildung 6 zeigt den Aufbau von pIRES. Der pIRES-Expressionsvektor kommt bei Säugetieren vor und beinhaltet die *encephalomyocarditis virus* (ECMV) *internal ribosome entry site* (IRES) sowie ein Neomycin-Resistenzgen, was die Selektierung stabil transfizierter Zell-Klone ermöglicht (Rees et al. 1996). Als IRES wird in der Zellbiologie eine spezifische Faltung (Sekundärstruktur) der messenger-RNA bezeichnet, die ohne weitere so genannte Initiationsfaktoren die Bindung der mRNA an die Ribosomen vermittelt. Dadurch kann die Translation unmittelbar gestartet werden (Thompson 2012). Die Expression von IL-37 wird durch den *constitutively active cytomegalovirus immediate early promoter* (PCMV-IE) gesteuert. Der CMV-Promotor stammt aus dem humanen Cytomegalievirus und ist dafür bekannt, ein sehr stabiler und kraftvoller Promotor zu sein (Boshart et al. 1985, Thomsen et al. 1984, Ghazal et al. 1987). Er ist in einem breiten Spektrum von Zell-Typen aktiv und der am häufigsten genutzte Promotor in mammalischen Expressionsvektoren (Boshart et al. 1985, Foecking und Hofstetter 1986, Sevarino et al. 1987).

IL-37 weist keine Spezies-Spezifität auf, sodass die Expression von humanem IL-37 in Mäusen und Mausmakrophagen dem IL-37-Expresionsmuster in humanen Zellen entspricht (Sharma et al. 2008).

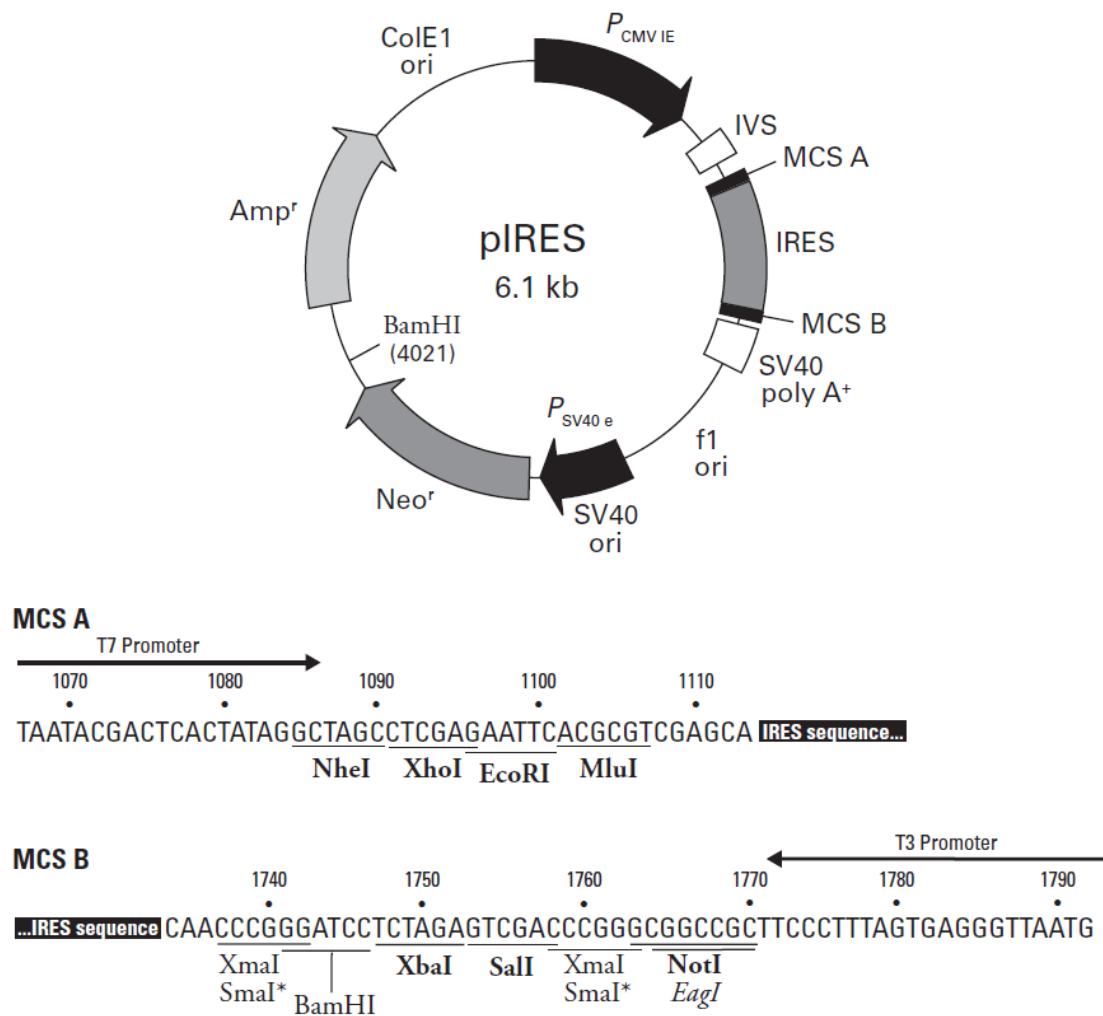


Abbildung 6: pIRES Vektorinformation

Die Darstellung wurde von Clontech übernommen.

4 Ziele der Arbeit

IL-37 gehört der IL-1 Genfamilie an und hat aufgrund seiner anti-inflammatorischen und immunsupprimierenden Eigenschaften in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung

gewonnen. Der Fokus wurde bei den Arbeiten auf die Rolle von IL-37 bei Erkrankungen, die mit entzündlichen Prozessen oder Autoimmunreaktionen einhergehen, gelegt (Teng et al. 2014, Ye et al. 2015a, Ye et al. 2014a, McNamee et al. 2011, Sakai et al. 2012, Ballak et al. 2014, Nold et al. 2010, Lunding et al. 2015, Xu et al. 2015, Wu et al. 2013, Coll-Miro et al. 2016, Zeng et al. 2017). Bezüglich der Bedeutung von IL-37 bei entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen existieren bereits viele Studien. Zur Rolle von IL-37 bei mikrobiellen Infektionen, insbesondere bei Infektionen mit Bakterien, wurde bisher nur wenig publiziert (Moretti et al. 2014, van de Veerdonk et al. 2014, Huang et al. 2015, Zhao et al. 2017).

Das humanpathogene Bakterium *S. pneumoniae* kann neben leichten Infektionen auch schwer verlaufende Erkrankungen hervorrufen (van der Poll und Opal 2009, Lozano et al. 2012). Dabei ist als schwere Komplikation einer Pneumokokken-Pneumonie die Bakteriämie zu sehen, die in einer Sepsis resultieren kann (Lee et al. 1991). Die Pneumokokken-Pneumonie an sich ist durch eine starke Entzündungsreaktion gekennzeichnet, wobei vor allem Zytokine bei der Aktivierung des Immunsystems eine wichtige Rolle spielen (Tuomanen et al. 1995, Nelson und Summer 1998). Deshalb stellen die anti-inflammatorischen Eigenschaften sowie das immunsupprimierende Potential von IL-37 einen interessanten Ansatz dar, seine Bedeutung im Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie zu analysieren. Unter Verwendung stabil mit IL-37 transfizierter Mausmakrophagen sowie eines IL-37 transgenen Mausmodells sollen folgende Fragen adressiert werden:

- 1.) Welches Expressionsprofil zeigt humanes IL-37 in stabil transfizierten RAW-Zellen (RAW-IL-37) nach Stimulation mit *S. pneumoniae* und sind Veränderungen bezüglich der dadurch induzierten Immunreaktion im Vergleich zu den RAW-Vektor Zellen zu beobachten?
- 2.) Wird humanes IL-37 in transgenen Mäusen als Folge einer Infektion mit *S. pneumoniae* exprimiert?
- 3.) Welchen Einfluss hat IL-37 im Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie auf:
 - a) die Überlebensrate?
 - b) die bakterielle Belastung der Lunge und des Blutes?

- c) das Expressionsmuster von pro-inflammatorischen Zytokinen und Entzündungsmediatoren und dessen zeitliche Regulation?
 - d) die Rekrutierung von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten?
 - e) histologische Veränderungen des Lungengewebes?
- 4.) Beeinflusst IL-37 die Phagozytose-Leistung sowie die intrazelluläre Eliminierung von *S. pneumoniae* in RAW-Zellen?

Insgesamt soll diese Arbeit einen ersten Einblick über die Bedeutung des anti-inflammatorischen IL-37 für die Immunantwort gegen *S. pneumoniae* geben.

5 Material und Methodik

5.1 Material

Bei allen in diesem Kapitel nicht aufgeführten Chemikalien handelt es sich um in Laboratorien standardmäßig eingesetzte Substanzen, welche alle den analytischen Reinheitsgraden entsprechen und, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Sigma Aldrich GmbH oder Carl Roth GmbH bezogen wurden.

5.1.1 Verwendete Zelllinien und Bakterienstämme

5.1.1.1 Zelllinien

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Mausmakrophagen-ähnliche Zelllinie RAW 264.7 verwendet (ATCC® TIB-71™). Die RAW-Zellen stammen ursprünglich aus einer Makrophagen-Präparation einer BALB/c Maus, die aufgrund einer Infektion mit dem Abelson-Maus-Leukämievirus (Ab-MLV) Tumore entwickelt hatte (Raschke et al. 1978). Die Zelllinie wird häufig als Mausmakrophagen-Modell genutzt, um zelluläre Antworten auf Infektionen mit Pathogenen zu untersuchen. Die Zellen waren zu Beginn dieser Arbeit bereits stabil mit dem pIRES-Leervektor (RAW-Vektor-Zellen) oder mit dem pIRES-IL-37-Vektor (RAW-IL-37-Zellen) transfiziert. Die Vorarbeiten dafür hat Dr. Anne Schneeweiß geleistet.

5.1.1.2 Bakterienstämme

Für Infektionsversuche wurden die *S. pneumoniae*-Stämme D39 Serotyp 2 (bekapselter Wildtyp; kurz: D39) und D39 Δ cps (unbekapselte Mutante) verwendet. Beide Stämme wurden uns freundlicherweise von Hester Bootsma, PhD (Laboratory of Pediatric Infectious Diseases Radboud University Nijmegen Medical Center, Niederlande) zur Verfügung gestellt.

Da die Polysaccharidkapsel einen der wichtigsten Virulenzfaktoren darstellt (Kadioglu et al. 2008), wurden für die *in vitro*-Versuche zum Vergleich der Pathogenität beide Bakterienstämme verwendet. Für die Infektionsversuche *in vivo* wurde nur der *S. pneumoniae*-Stamm D39 eingesetzt. Begründen lässt sich das mit Beobachtungen, dass Pneumokokken für den Kontakt mit dem Wirt die Polysaccharidkapsel benötigen und demzufolge Stämme, die weniger Kapsel-Proteine synthetisieren eine verringerte

Pathogenität aufweisen, was ihnen die Umgehung des Immunsystems erschwert (Hammerschmidt et al. 2005).

5.1.2 Medien

5.1.2.1 Zellkultur

Bezeichnung des Mediums	Zusammensetzung
Kulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) 10% FBS (vor Gebrauch für 30min bei 56°C hitzeinaktiviert) 1 % Penicillin-Streptomycin 100-fach Konzentrat
Stimulationsmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM)
Medium für Kryokonservierung	70% Dulbecco's Modified Eagle Medium High Glucose (DMEM) 20% FBS 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)

5.1.2.2 Bakterienkultur

Bakterienmedien, die selbst hergestellt wurden, wurden vor Verwendung im Autoklav für 20 min bei 221°C sterilisiert und anschließend auf RT abgekühlt.

Bezeichnung des Mediums	Zusammensetzung
Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten	12 g/l pankreatisch abgebautes Casein 5 g/l peptisch abgebautes Tiergewebe

	3 g/l Hefeextrakt
	3 g/l Rindfleischextrakt
	1 g/l Maisstärke
	5 g/l Natriumchlorid
	13,5 g/l Agar
	4 g/l Wachstumsfaktoren
	5% Defibriniertes Schafsblut
THY-Flüssigmedium	30 g/l Todd-Hewitt-Bouillion
	5 g/l Hefeextrakt
	1l A. dest
Kryomedium	80% THY-Flüssigmedium
	20% Glycerol

5.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Substanz	Hersteller
2x SensiMix SYBR No-ROX	Bioline GmbH
ABC-Alkalische Phosphatase (AP)	Vector Laboratories Inc.
ABC-Meerrettich Peroxidase (HRP)	Vector Laboratories Inc.
Agarose	Sigma Aldrich GmbH
Aluminiumkaliumsulfat ($KAl(SO_4)_2$)	Merck
Benzonase® Nuclease	Sigma Aldrich GmbH
Borsäure	Carl Roth GmbH
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma Aldrich GmbH
Chloralhydrat ($C_2H_3Cl_3O_2$)	AlpiChem
Citronensäure-Monohydrat ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$)	Carl Roth GmbH
Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten	BD Biosciences
cOmplete™, Mini, EDTA-free, Protease Inhibitor	Roche
Cocktail	
Diaminobenzidin (DAB)	Merck
Diff-Quik Färbeset	Medion Diagnostics
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma Aldrich GmbH
DNaseI	Qiagen

dNTPs	Promega Corporation
Dulbecco's Modified Eagle Medium	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
High Glucose (DMEM)	Carl Roth GmbH
Ethanol (vergällt)	Carl Roth GmbH
Ethanol (nicht vergällt)	Sigma-Aldrich GmbH
Ethidiumbromid-Lösung	Sigma-Aldrich GmbH
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Biochrom AG
Fetales Rinderserum (FBS)	Sigma-Aldrich GmbH
Fluoresceinisothiocyanat (FITC)	BioLabs
Gel Loading Dye Purple (6x)	gibco® Life Technologies Corporation
Geneticin (50 mg/ml)	gibco® Life Technologies Corporation
Gentamycin (50 mg/ml)	Sigma-Aldrich GmbH
Glycerol	Merck
Hämatoxylin	Carl Roth GmbH
Hefeextrakt	Lonza Group Ltd
HEPES gepufferte Lösung (HBSM)	Fresenius Kabi
Isotonische Kochsalzlösung (0,9 %-ig)	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH
Kaliumhydroxid (KOH)	Vector Laboratories Inc
Levamisol Lösung SP 5000	Sigma Aldrich GmbH
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Enzo Lifescience
MALP-2	Carl Roth GmbH
Mowiol Eindeckelmedium	Sigma Aldrich GmbH
Naphtol-AS-Biphosphat	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumiodat	Merck
Natriumnitrit (NaNO ₂)	Sigma Aldrich GmbH
Neufuchsin N-0638	Merck
N-N-Dimethylformamid	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
Penicillin-Streptomycin	5-Prime GmbH
Perfect-LoadDye Konzentrat (10x)	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus DNA Polymerase	5-Prime GmbH
PerfectTaq Plus PCR Puffer (10x)	5-Prime GmbH

Phosphatgepufferte Lösung nach Dulbecco (DPBS)	Invitrogen™ Life Technologies Corporation
Protease Inhibitor Cocktail Set	Calbiochem
Rekombinantes IL-37	R&D Systems
RNase- und DNase-freies A. dest	Ambion GmbH, Life Technologies
Roti®-Histofix 4%	Carl Roth GmbH
Roti-Immunblock	Carl Roth GmbH
Schwefelsäure	Carl Roth GmbH
Todd-Hewitt-Bouillion	Carl Roth GmbH
tri-Natriumcitrat-Dihydrat	ChemSolute (Th. Geyer)
Tris	Medicago und Carl Roth GmbH
Tris- Hydrochlorid (Tris-HCl)	Sigma Aldrich GmbH
Triton-X 100	Carl Roth GmbH
Trypanblau	gibco® Life Technologies Corporation
TWEEN 20	Sigma Aldrich GmbH
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂)	Merck
Zitronensäure	Serva oder Carl Roth GmbH

5.1.4 Puffer, Lösungen, Gele

Puffer / Lösung / Gel	Zusammensetzung
DNA-Gel, 2%-ig (Gelelektrophorese)	Agarose in TBE (2 g/100ml) Ethidiumbromid (25 µg/100ml)
5x TBE Laufpuffer (Gelelektrophorese)	89 mM Tris (pH 8,0) 89 mM Borsäure 2 mM EDTA A. Dest
Waschpuffer (ELISA)	99,95% DPBS 0,05% TWEEN20
Blockpuffer (ELISA)	90% DPBS 10% FBS

Stopplösung (ELISA)	445 ml A. dest 55 ml 96%-ige Schwefelsäure
Hämalaun Färbelösung (Immunhistochemie)	Hämatoxylin (1g/l) Natriumiodat (0,2 g/l) Aluminiumkaliumsulfat (50 g/l) Chloralhydrat (50 g/l) Zitronensäure (0,5 g/l)
Neufuchsin Färbelösung (Immunhistochemie)	Natriumnitrit (0,1 g/100ml) Naphtol-AS-Biphosphat (0,1 g/100ml) 0,6% Levamisol 0,2% Neufuchsin 1,2% N-N-Dimethylformamid 0,05 M Tris (pH 8,7)
Puffer 1 pH 7,2 (zelluläre Fraktionierung)	2 mM Kaliumchlorid 1,5 mM Magnesiumchlorid 10 mM HEPES 1% Proteinaseinhibitor
Puffer 2 pH 7,2 (zelluläre Fraktionierung)	420 mM Natriumchlorid 1 mM Magnesiumchlorid 20 mM HEPES 1% Triton-X 100
TE-Puffer pH 7,4 (Verdünnung cDNA)	10 mM Tris-HCL 1 mM EDTA
Lyse-Puffer pH 12 (Genotypisierung)	25 mM Natriumhydroxid 0,2 mM EDTA
Neutralisierungspuffer pH 5 (Genotypisierung)	40 mM Tris-HCL

5.1.5 Primer

Tabelle 2: Primer-Sequenzen für die *real-time* qPCR und semiquantitative PCR

Human (h); Maus (m) Gen	Symbol	Sequenz (5' → 3')	Produktlänge
h-Interleukin-37	<i>IL37</i>	<i>Forward:</i> GGAAGTCCGATTCTCCTGGGGGT <i>Reverse:</i> GGCCGGCGTGCTGATTCCTT	143 bp
m-Interleukin-6	<i>IL6</i>	<i>Forward:</i> ACCACTTCACAAGTCGGAGG <i>Reverse:</i> TCTGCAAGTGCATCATCGTT	116 bp
m-Interleukin-1 beta	<i>IL1β</i>	<i>Forward:</i> AGGAGAACCAAGCAACGACA <i>Reverse:</i> TCTGCTTGTGAGGTGCTGAT	210 bp
m-Tumor necrosis factor-alpha	<i>TNFα</i>	<i>Forward:</i> GGCCTCCCTCTCATCAGTTC <i>Reverse:</i> TTTGCTACGACGTGGGCTAC	95 bp
m-Ribosomal protein- L13A	<i>RPL13A</i>	<i>Forward:</i> TACGCTGTGAAGGCATCAAC <i>Reverse:</i> CTCGGGAGGGGTTGGTATTC	99 bp

5.1.6 Antikörper

Tabelle 3: Primäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Kaninchen-anti-Caspase-3 (Polyklonal)	Immunhistochemie	R&D Systems
Kaninchen-anti-S. <i>pneumoniae</i>	Immunhistochemie	Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. rer. nat. Sven Hammerschmidt (Interfakultäres Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung, Ernst Moritz Arndt Universität, Greifswald)

Tabelle 4: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller
Ziege-anti-Kaninchen (biotinyliert)	Immunhistochemie	Vector Laboratories Inc.

5.1.7 Im Tierversuch eingesetzte Medikamente

Substanz	Hersteller
Fentanyl	verschiedene Hersteller
Midazolam	verschiedene Hersteller
Medetomidin	verschiedene Hersteller
Atipamezol	verschiedene Hersteller
Flumazenil	verschiedene Hersteller
Naloxon	verschiedene Hersteller
Ketamin (Ketavet)	Zoetis Deutschland GmbH
Xylazin (Rompun®)	Bayer AG

5.1.8 Kommerziell erhältliche Kits

Kit	Hersteller
Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Group I, 9-Plex Assay	Bio-Rad Laboratories
Cell-Lysis Kit	Bio-Rad Laboratories
Mouse IL-6 ELISA Ready-Set-Go	eBiosciences
Mouse-IL-1 β ELISA Ready-Set-Go	eBiosciences
Mouse-TNF- α ELISA Ready-Set-Go	eBiosciences
IL-37 (human) ELISA Kit	Adipo-Gen
RNeasy mini Kit	Qiagen
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems® Life Technologies

5.1.9 Verbrauchsmaterialien, Geräte, Laborutensilien, Software

Verbrauchsmaterial	Hersteller
10 cm Zellkulturschalen	Corning, Inc.
15-/50 ml-Röhrchen mit Schraubverschluss	Greiner Bio-One
Cell Scraper 25 cm	Falcon®
Costar® 6well-Platten	Corning, Inc.
Costar® 12well-Platten	Corning, Inc.
Einmal-Impfösen 10 μ l, steril	VWR International GmbH
Einmal-Küvetten	Sarstedt
FastPrep® Lysing Matrix Tubes	MP Biomedicals

Filtropur S 0,2 µm	Sarstedt
Histokassette	
Introcane [®] -W Venenverweilkanüle (24G x ¾“)	Braun
Menzel-Gläser 20 x 20 mm	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Menzel-Gläser Polysine [®] Slides	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Neubauer Zählkammer	Laboroptik
NuncImmunoMaxisorp 96well	VWR International
Flachbodenplatte	
Omnifix [®] -F 1 ml Einmalspritze	Braun
Petrischalenspatel Delta [™] , steril	Heathrow Scientific
Pipettenspitzen für Einkanalpipetten (verschiedene Größen)	Starlab International GmbH
Pipettenspitzen Clip Tip für Mehrkanalpipette (verschiedene Größen)	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Safelock Tubes (0,5 ml; 1,5 ml; 2 ml)	Eppendorf AG
Schlinggazetupfer Set (20 x 20 cm)	Fuhrmann [®]
Schraubbecher (100 ml)	Sarstedt
Serologische Pipetten (5 ml; 10 ml; 25 ml; 50 ml)	Greiner Bio-One
Sterican [®] Einmal-Injektionskanülen (21G x 1“; 25G x 5/8“; 27G x ¾“)	Braun
Sterile Wattestäbchen	NOBA Verbandmittel Danz GmbH Co KG
Vasco [®] Nitril white Einmalhandschuhe	Braun
Verschlussfolien für Mikrotiterplatten	VWR International
Zellheber	VWR International

Geräte/Laborutensilien

Hersteller

Absauggerät VACUSAVE	Integra Biosciences
Bechergläser, Messzylinder, Schraubflaschen	verschiedene Hersteller
Biophotometer 6132 plus	Eppendorf AG
BioPlex 200TM System	Bio-Rad Laboratories
CO ₂ -Inkubator Galaxy 170S	NewBrunswick – Eppendorf AG
CO ₂ -Inkubator HERA cell 150	Thermo Fisher Scientific, Inc.
Corbett Rotor-Gene 6000	Corbett Life Science

Einkanalpipetten Research plus
 Elektrophorese-System, Powerpac™ HC
 Power Supply
 FastPrep-24™ SPS Gewebehomogenisator
 Fusion Fx7
 Haereus Multifuge X3R
 Handdispenser Multipette® plus
 Infinite® M200
 Inverses Mikroskop Axio.Vert. A1
 Kryobehälter
 Kryoröhrchen
 Magnetrührer VS-C7
 Mehrkanalpipette F1-Clip Tip
 NanoDrop D-1000 Spectrophotometer
 OP-Besteck (Scheren, Pinzetten, etc.)
 pH-Messgerät
 Präzisionswaage EWB 620-2M
 Roboter CAS-1200
 S1000™ Thermal Cycler
 Sicherheitswerkbank Maxisafe 2020
 Sicherheitswerkbank HERA safe
 Stereomikroskop primover
 Thermomixer COMPACT_5350
 VortexGenie 2
 Wasserbad TW20
 Zentrifuge 5810 R
 Zentrifuge 5804 R
 Zentrifuge 5418 R

Eppendorf AG
 Bio-Rad Laboratories

 MP Biomedicals
 PeQlab Biotechnologie GmbH
 Thermo Fisher Scientific, Inc.
 Eppendorf AG
 Tecan Group Ltd.
 Carl Zeiss MicroImaging GmbH
 KGW Isotherm
 verschiedene Hersteller
 VWR™ International
 Thermo Fisher Scientific, Inc.
 Thermo Fisher Scientific, Inc.
 verschiedene Hersteller
 Mettler-Toledo®
 Sartorius
 Corbett Life Science
 Bio-Rad Laboratories
 Thermo Fisher Scientific, Inc.
 Thermo Fisher Scientific, Inc.
 Carl Zeiss MicroImaging GmbH
 Eppendorf AG
 Scientific Industries, Inc.
 Julabo GmbH
 Eppendorf AG
 Eppendorf AG
 Eppendorf AG

Software

- Graph Pad Prism Version 5.0
- Rotor-Gene Q (Qiagen), 5plex HRM, Software Version 2.3.1
- RotoGene 6000 Series (Corbett Robotics), 5plex, Software Version 1.7
- CAS-1200 liquid handling system (Corbett Robotics), Software Version 4.9
- Excel Microsoft Office Standard 2010, Version 14.0.7181.5000

- NanoDrop 1000 (Thermo Scientific)
- Adobe Photoshop CS5 Version 12.0
- Fusion Fx7 peqlab Biotechnologie GmbH (Vilber-Lourmat), Software Version 15.18 für Windows
- Zeiss AxioVert.A1 mit Hellfeld, Phasenkontrast, PlasDIC, Fluoreszenz (Filter: 49 (DAPI), 38 (HE-FITC), 43 (DsRed), Software: Zen 2.0 (blue edition), Kamera: AxioCam MRc
- Zeiss PrimoVert, Kamera AxioCam ERc5s, Software: Zen 2.0 (blue edition)
- Tecan infinite M200, Software Magellan Version 6.6

5.2 Methoden

5.2.1 Tierexperimente

Alle Tierversuche wurden durch das Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV), Bad Langensalza genehmigt (Genehmigungsnummern: 02-067/11 und 02-043/15) und in den Experimentierräumen des Tierhauses 5 am Forschungszentrums Jena-Beutenberg (FZB) durchgeführt.

5.2.1.1 Versuchstiere

Für die Tierexperimente wurden weibliche, 9 Wochen alte Wildtyp-Mäuse (WT) des Stammes C57BL/6J sowie weibliche IL-37-transgene Mäuse (IL-37tg) mit genetischem Hintergrund des Stammes C57BL/6J verwendet. Die IL-37-transgene Mauslinie wurde von Prof. Charles Dinarello (Department of Medicine, University of Colorado Denver, Aurora, Colorado, United States of America) generiert und uns zur Verfügung gestellt und weist keine phänotypischen Besonderheiten im Vergleich zu den Wildtypen auf (Nold et al. 2010). Die Zucht und Haltung der Tiere erfolgte in der SPF-Einheit (engl.: *specific pathogen free*) des Tierhauses 5 (Forschungszentrum Jena-Beutenberg) bei $22 \pm 2^\circ\text{C}$, einer relativen Luftfeuchte von $55\% \pm 10\%$ sowie einem festen Tag-Nacht-Zyklus von je 12 h. Die Tiere hatten freien Zugang zu autoklavierter, pelletierter Standardnahrung und autoklaviertem, angesäuerten Wasser (pH 2,5-3,0). In die Versuche wurden ausschließlich gesunde Tiere mit normalem Fress- und Putzverhalten aufgenommen. Vor jedem Infektionsversuch wurden die IL-37tg- und die WT-Mäuse genotypisiert.

5.2.1.2 Genotypisierung

Für die Genotypisierung der in den Versuchen verwendeten IL-37tg- und WT-Mäuse wurde zunächst genomische DNA aus Schwanzbiopsien isoliert. Hierfür wurden die Schwanzspitzen mit 75 µl Lyse Puffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.4) versetzt und für 30 min bei 95°C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Abkühlung der Proben für 5 min auf Eis. Nach Zugabe von 75 µl Neutralisierungspuffer (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.4) wurden die Proben vorsichtig gemischt und anschließend erfolgte eine semiquantitative PCR zum Nachweis des *IL37* Gens. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 2 aufgelistet. Die Amplifizierung der entsprechenden DNA-Fragmente erfolgte nach den PCR-Konditionen in Tabelle 8 über 35 Zyklen.

Zur Bestimmung des Genotyps wurden die PCR-Produkte anschließend in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem UV-Transilluminator („Fusion Fx7“, PeQlab Biotechnologie GmbH) sichtbar gemacht (Abbildung 7).

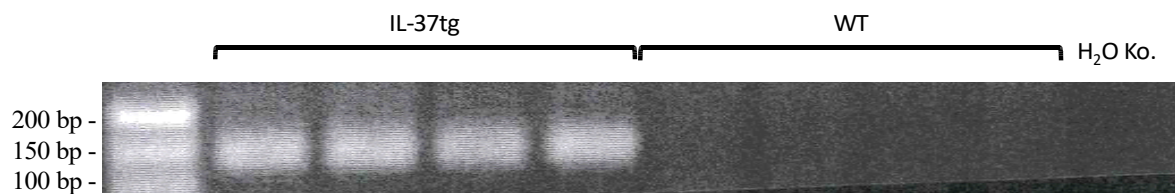


Abbildung 7: Genotypisierung der Versuchstiere

Repräsentative Darstellung von elektrophoretisch aufgetrennten PCR-Fragmenten zur Bestimmung des Genotyps von IL-37tg- und WT-Mäusen. DNA-Banden im Agarose-Gel zeigen das Vorhandensein von IL-37 (erwartete Bandengröße des Fragments 143 bp) bei den IL-37tg-Mäusen sowie das Nichtvorhandensein von IL-37 bei den WT-Mäusen an. Zusätzlich wurde eine H₂O-Kontrolle mitgeführt.

5.2.1.3 Infektionsmodell mit *S. pneumoniae*

Zur Induktion einer *S. pneumoniae*-assoziierten Pneumonie wurden die Versuchstiere zunächst durch eine intraperitoneale Injektion von 120 µl eines Gemisches aus Medetomidin (0,5 mg/kg), Midazolam (5 mg/kg) und Fentanyl (0,05 mg/kg) tief narkotisiert. Nach Überprüfung einer ausreichenden Narkosetiefe durch Ausfall des Lidreflexes sowie des Zwischenzehenreflexes, wurde den Tieren intranasal in einem Volumen von 20 µl der *S. pneumoniae*-Stamm D39 (5×10^7 CFU/Maus; engl.: *colony forming units*), gelöst in PBS, appliziert. Kontrollgruppen (*Sham*-Tiere) erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS.

Im Anschluss wurden die Tiere, unter Kontrolle der Atmung, für 10 min auf ein Wärmekissen gebettet. Durch die subkutane Injektion einer Kombination aus Atipamezol (2,5 mg/kg), Flumazenil (0,5 mg/kg) und Naloxon (1,2 mg/kg) wurde die narkotisierende Wirkung innerhalb weniger Minuten aufgehoben und die Tiere in den Wachzustand zurückversetzt. Die Tiere wurden nach dem Erwachen aus der Narkose, wie in Kapitel 5.2.1.1 beschrieben, weiter bis zur Euthanasie versorgt.

Durch vorangegangene Dosisfindungsversuche, bei denen 5×10^6 , 5×10^7 5×10^8 CFU/Maus miteinander verglichen wurden, konnte die optimale Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus ermittelt werden. Bei dieser Bakterienkonzentration zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Suszeptibilität von WT-Mäusen und IL-37tg-Mäusen. Darüber hinaus wurde mit dieser Bakterienkonzentration ein Krankheitsverlauf bei den Tieren hervorgerufen, der nicht zum unmittelbaren Tod führte, sondern mit der im geeigneten zeitlichen Rahmen eine LD₉₀ (letale Dosis, deren letaler Effekt sich auf 90 Prozent der beobachteten Population bezieht) erreicht werden konnte. Zur Kontrolle der Infektionsdosis wurde bei jedem Infektionsexperiment ein Teil des Infektionsgemisches auf Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten ausgestrichen, bei 37°C und 5% CO₂ für 20 h inkubiert und anschließend ausgezählt. Nach Infektion wird auch als *post infectionem* bezeichnet.

5.2.1.4 Überlebenszeitanalyse

Nach der intranasalen Instillation des *S. pneumoniae*-Stammes D39 wurde der Krankheitsverlauf alle 12 h kontrolliert. Neben Körpertemperatur und Gewicht wurde der Grad der Aktivität, das Trink- und Fressverhalten, das Aussehen von Fell und Augen, die Atmung sowie das Sozialverhalten für jedes Tier einzeln dokumentiert und je nach Ausmaß der Erkrankung nach einem Punktesystem bewertet (siehe Anhang, 10.1). Die Versuchsdauer betrug insgesamt 96 h. Die Anzahl der überlebenden Tiere wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt notiert und mittels einer Kaplan-Meier-Kurve visualisiert. Basierend auf dieser Kurve wurde der zeitliche Rahmen für alle Folgeexperimente auf 8 h, 24 h und 48 h nach Infektion gelegt.

5.2.1.5 Entnahme von Blut, Bronchoalveolärer Lavage (BAL) und Lunge

Durch intraperitoneale Gabe eines Gemisches aus Ketamin (160 mg/kg) und Xylazin (75 mg/kg) in einem Gesamt-Volumen von 200 µl/Maus wurden die Tiere zunächst tief narkotisiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Ausfall des Lidreflexes sowie des Zwischenzehenreflexes, erfolgte die Eröffnung des Brust- und Bauchraumes. Über die

Punktion der hinteren Hohlvene (lat.: *Vena cava caudalis*) wurde Blut ohne Zusätze entnommen. Anschließend wurden die Tiere durch Entbluten über die hintere Hohlvene euthanasiert. Ein Teil des Blutes wurde für 10 min bei RT und 5000 x g zentrifugiert. Der Serumanteil wurde in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur späteren Verwendung im ELISA und Multiplex-ELISA gelagert. Der andere Teil wurde bei 4°C gelagert und für die Bestimmung der Bakterienlast noch am Versuchstag verwendet. Zur Entnahme der BAL wurde die Luftröhre (lat.: *Trachea*) zwischen zwei Knorpelspangen eröffnet und eine Venenverweilkanüle (24G) eingebracht, über die in die Lungen 4-mal eiskaltes PBS, versetzt mit 1 Tablette cOmplete™, Mini, Protease Inhibitor Cocktail (Roche) in einem Volumen von jeweils 800 µl eingebracht und wieder abgesaugt wurde. Die gewonnene Flüssigkeit aus den 4 Spülungen wurde in einem sterilen Eppendorf Gefäß zusammengeführt. Durch Abzentrifugieren der BAL für 10 min bei 4°C und 500 x g konnten die Zellen vom flüssigen Teil getrennt werden. Der Überstand wurde in Kryoröhrchen überführt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei -80°C bis zur späteren Verwendung im ELISA und Multiplex-ELISA gelagert. Das Zellpellet wurde in einem Gemisch aus PBS-EDTA (2 mM)-FBS (10%) gelöst und bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gelagert. Anschließend wurden die Lungen steril entnommen, geteilt und jeweils in Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung bis zur weiteren Verwendung erfolgte bei -80°C. Für die Bestimmung der Bakterienlast wurden beide Lungenflügel in steriles PBS überführt, bei 4°C gelagert und noch am Versuchstag verarbeitet.

5.2.1.6 Bestimmung der Bakterienlast

Zunächst wurden Lunge, BAL und Blut, wie in Kapitel 5.2.1.5 beschrieben, entnommen. BAL und Blut wurden in verschiedenen Verdünnungen (verdünnt mit PBS) auf Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten ausgestrichen, bei 37°C und 5% CO₂ für 20 h inkubiert und anschließend ausgezählt. Die Lunge wurde in PBS zunächst in speziellen *Lysing-Matrix-Tubes* (MP Biomedicals) mittels eines Gewebe-Homogenisators (FastPrep-24 SPS; MP Biomedicals) zerkleinert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen (verdünnt mit PBS) des homogenen Gemisches auf Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten ausgestrichen, bei 37°C und 5% CO₂ für 20 h inkubiert und ausgezählt.

5.2.1.7 Gewinnung und immunhistochemische Färbung muriner Lungenschnitte

Für die immunhistochemische Färbung von Lungenschnitten muss die gesamte Lunge ohne Inzisionen/Verletzungen über eine spezielle Entnahmetechnik aus dem Tier entfernt werden. Dazu wurde folgendermaßen vorgegangen:

Durch intraperitoneale Gabe eines Gemisches aus Ketamin (160 mg/kg) und Xylazin (75 mg/kg) in einem Volumen von 200 µl/Maus wurden die Tiere zunächst tief narkotisiert. Nach Überprüfung der Narkosetiefe durch Ausfall des Lidreflexes sowie des Zwischenzehenreflexes, erfolgte die Eröffnung des Bauchraumes. Über die hintere Hohlvene wurden die Tiere durch Entbluten euthanasiert. Anschließend wurde die Trachea freigelegt und mittels eines chirurgischen OP-Fadens (B. Braun) abgebunden. Erst dann erfolgten die Eröffnung des Brustkorbes und die Entnahme der gesamten Lunge, was ein Kollabieren der Lunge verhindert. Die Immunhistochemie wurde durch die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gruber (Institut für Tierpathologie; Freie Universität Berlin) durchgeführt. Dazu wurden die Lungen in 4% Paraformaldehyd (Roti®-Histofix 4%; Carl Roth) für 24 h bei RT fixiert, anschließend in Paraffin eingebettet und zu 2µm dicken Schnitten verarbeitet. Die Schnitte wurden für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) oder immunhistochemisch für die Detektion von *S. pneumoniae* oder aktive Caspase-3 verwendet. Einen Überblick über den Ablauf der einzelnen Färbungen gibt Tabelle 5.

Tabelle 5: Färbeprotokolle der verwendeten immunhistochemischen Färbungen

HE-Färbung	<i>S. pneumoniae</i>	Aktive Caspase-3
Deparaffinisierung (3 x Xylol je 3 min)	Deparaffinisierung (3 x Xylol je 3 min)	Deparaffinisierung (3 x Xylol je 3 min)
absteigende Alkoholreihe (2 x 100% Ethanol je 1 min, 96% Ethanol 1 min, 80% Ethanol 1 min, 70% Ethanol 1 min, H ₂ O 1,5 min)	absteigende Alkoholreihe (2 x 100% Ethanol je 1 min, 96% Ethanol 1 min, 80% Ethanol 1 min, 70% Ethanol 1 min, H ₂ O 1,5 min)	absteigende Alkoholreihe (2 x 100% Ethanol je 1 min, 96% Ethanol 1 min, 80% Ethanol 1 min, 70% Ethanol 1 min, H ₂ O 1,5 min)
Hämalaun (8 min)	Blocken der endogenen Peroxidase mit PBS + H ₂ O ₂	Blocken der endogenen Peroxidase mit PBS + H ₂ O ₂
H₂O (5 min)	Vorbehandlung mit Citratpuffer für 12 min bei 600 W	Vorbehandlung mit Citratpuffer für 12 min bei 600 W
Eosin (30 sec)	Blocken Normalserum (Ziege) 1:5 und Roti-Immunoblock-PBS 1:10, 30 min, RT	Blocken Normalserum (Ziege) 1:5 und Roti-Immunoblock-PBS 1:10, 30 min, RT
H₂O (5 sec)	1. Antikörper Kaninchen-anti- <i>S. pneumoniae</i> , polyklonal, 1:2000 verdünnt mit PBS/BSA 2% über Nacht bei 4°C	1. Antikörper Kaninchen-anti-Caspase-3 (AF835, R&D Systems), 1:1000 verdünnt mit PBS/BSA 2% über Nacht bei 4°C

aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol 5 sec, 80% Ethanol 5 sec, 96% Ethanol 1 min, 100% Ethanol 1 min, 100% Ethanol 2 min)	Negativkontrolle Biogenex rabbit 1:2000 verdünnt mit PBS/BSA 2% über Nacht bei 4°C	Negativkontrolle Biogenex rabbit 1:1000 verdünnt mit PBS/BSA 2% über Nacht bei 4°C
Xylol (4 x je 2 min)	2. Antikörper Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert, 1:200 verdünnt mit PBS /Goat NS, 30 min bei RT	2. Antikörper Ziege-anti-Kaninchen, biotinyliert, 1:200 verdünnt mit PBS /Goat NS, 30 min bei RT
Eindeckeln	Entwicklung ABC-Alkalische Phosphatase (AP) Kit, 30 min bei RT	Entwicklung ABC-Meerrettich Peroxidase (HRP) Kit, 30 min bei RT
	Färbung Neufuchsin (Triamino- tritoly- methanchlorid), 20 min bei RT	Färbung DAB (Diaminobenzidin), 8 min bei RT
	Gegenfärbung Hämalaun 2 min. bei RT	Gegenfärbung Hämalaun 2 min. bei RT
	aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol 5 sec, 80% Ethanol 5 sec, 96% Ethanol 1 min, 100% Ethanol 1 min, 100% Ethanol 2 min)	aufsteigende Alkoholreihe (70% Ethanol 5 sec, 80% Ethanol 5 sec, 96% Ethanol 1 min, 100% Ethanol 1 min, 100% Ethanol 2 min)
	Xylol (4 x je 2 min)	Xylol (4 x je 2 min)
	Eindeckeln	Eindeckeln

5.2.1.8 Quantifizierung von Leukozyten-Subpopulationen aus der BAL

Zunächst wurde BAL, wie in Kapitel 5.2.1.5 beschrieben, entnommen. Anschließend wurden Leukozyten-Subpopulationen in Doppelbestimmungen zu je 100000 Zellen in einem Volumen von 100 µl PBS mittels einer Zytozentrifuge (Cytospin™ 4 Cytocentrifuge; Thermo Fisher Scientific, Inc.) auf Objektträger (Menzel-Gläser Polysine® Slides von Thermo Fisher Scientific, Inc.) gebracht. Durch das Anfärben der Zellen mit der Diff-Quik Methode, entsprechend des Protokolls des Herstellers (Medion Diagnostics), wurden die einzelnen Zellpopulationen sichtbar gemacht. Dabei handelte es sich ausschließlich um Alveolarmakrophagen und neutrophile Granulozyten. Unter dem Mikroskop wurden dann mit einer 40-fachen Vergrößerung pro Objektträger 2 mal 100 Zellen aus unterschiedlichen Bildausschnitten ausgezählt, den Subpopulationen zugeordnet und jeweils der Mittelwert bestimmt. Der Anteil an Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten konnte anschließend auf die berechnete Gesamtzellzahl/ml BAL hochgerechnet werden. Repräsentative Differentialinterferenzkontrast-Aufnahmen (DIC; engl.: *differential interference contrast*) der Diff-Quik Färbungen wurden mit einer 40-fachen Vergrößerung aufgenommen (ZEISS Axio Vert. A1).

5.2.2 Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten und steril filtrierten Lösungen.

Die Zellen wurden in einem CO₂-Begasungsbrutschrank im offenen System bei 37°C mit 5% CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95% kultiviert.

Alle Medien und Lösungen wurden vor Verwendung auf 37°C im Wasserbad vorgewärmt.

5.2.2.1 Kultivierung und Subkultivierung der Mausmakrophagen-Zelllinie RAW 264.7

Die RAW-Zellen wachsen adhärent als Monolayer auf beschichteten Zellkulturschalen und wurden alle 2-3 Tage bei ca. 95% Konfluenz subkultiviert. Für die Kultivierung wurde das Medium DMEM (High Glucose; Invitrogen™ Life Technologies Corporation) verwendet, das mit 10000 U/ml Penicillin, 10000 µg/ml Streptomycin ycin und 10 % FBS versetzt war. Zum Umsetzen wurden die Zellen zunächst mit PBS vorsichtig gewaschen (ca. 5 ml pro 10 cm Zellkulturschale) und anschließend mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Zum vereinzeln wurden die Zellen bei 200 x g für 5 min bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden die Zellen re-suspendiert. Die Zellen wurden dann in einem Verhältnis von 1:6 auf neue 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

Da die in dieser Arbeit verwendeten RAW-Zellen mit dem pIRES-Leervektor oder mit dem pIRES-IL-37-Vektor stabil transfiziert waren, wurde dem Medium zum Selektieren der positiven Zellen zusätzlich Geneticin (G418; 50 mg/ml) in einem Verhältnis von 1:100 zugesetzt. Der Mediumwechsel erfolgte alle 2-3 Tage beim Subkultivieren der Zellen.

5.2.2.2 Kryokonservierung von Zellen

Für die Kryokonservierung wurden die RAW-Zellen aus ca. 95% konfluenten Kulturen zunächst analog zur Subkultivierung gewaschen und mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Anschließend wurde die Zellsuspension in 50 ml-Zentrifugationsröhrchen überführt und bei 200 x g für 5 min bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dann in kaltem (4 °C) Kryokonservierungsmedium re-suspendiert und zu je 1 ml auf Kryoröhrchen verteilt. Diese wurden in einer Kryobox mit Isopropanolfüllung (Nalgene „MrFrosty“ *freezing container*,

Thermo Fisher Scientific, Inc.) für 24 h bei -80 °C inkubiert. Die Isopropanolfüllung bewirkt ein langsames und gleichmäßiges Herunterkühlen der Proben, was Schäden durch Kristallisationsprozesse minimiert. Anschließend wurden die Röhrchen in die Gasphase von Flüssigstickstoff (< -160 °C) gebracht.

5.2.2.3 Auftauen von Zellen

Die Kryoröhrchen wurden in einem Wasserbad bei 37 °C vollständig aufgetaut. Anschließend wurden die Zellen in 10 ml warmem Kulturmedium aufgenommen und 5 min bei 200 x g sedimentiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgesaugt, das Zellpellet in 10 ml Kulturmedium re-suspendiert und in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät.

5.2.2.4 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden die Zellen, wie bei der Subkultivierung beschrieben, von der Kulturschale abgelöst, zentrifugiert und re-suspendiert. Um nur die lebenden Zellen zu erfassen, wurden zunächst 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Der Farbstoff dringt dabei in abgestorbene oder perforierte Zellen ein und bindet an die im Zytosol vorhandenen Proteine, wodurch sich diese Zellen blau verfärben. Lebende Zellen nehmen kein Trypanblau auf und erscheinen farblos. 10 µl der Zellsuspension wurden anschließend auf eine Neubauer-Zählkammer gegeben und die Anzahl an Zellen über vier Großquadraten ermittelt und der Mittelwert berechnet. Mit Hilfe der Zellzahl, dem Verdünnungsfaktor (aus der Mischung mit der Zellsuspension und der Trypanblaulösung ergibt sich ein Verdünnungsfaktor 2) und der Kammerkonstante (10^4) lässt sich die Konzentration an Zellen in der Zellsuspension wie folgt berechnen:

$$\text{Zellzahl/ml} = (\text{Zellzahl aus 4 Großquadraten}) / 2 \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Kammerkonstante}$$

5.2.2.5 Stimulation der RAW-Zellen zur Gewinnung von RNA und Zellkultur-überstand

Für Stimulationsexperimente wurden RAW-Vektor- und RAW-IL-37-Zellen am Vortag in einer Dichte von 5×10^6 Zellen/Well in 6-Well-Platten ausgesät und am Folgetag, vor der Stimulation, mit antibiotikafreiem Stimulationsmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.2.1) versetzt. Am Versuchstag wurden die *S. pneumoniae*-Stämme D39 und D39Δcps, wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben, angezüchtet und mit einer Infektionsdosis von 1 Bakterium pro 20 Zellen (Multiplizität der Infektion (MOI) 0,05) stimuliert. Als Positivkontrolle wurden die Zellen mit MALP-2 in einer Konzentration von 0,1 µg/ml

stimuliert und im Brutschrank inkubiert. Als Kontrollen wurden unstimulierte Zellen mitgeführt. Nach abgelaufener Inkubationszeit von 2 h, 4 h, 6 h und 8 h wurde das Medium vollständig von den Zellen entfernt und diese sofort für die RNA-Isolation lysiert (siehe Kapitel 5.2.4.1). Für ELISA-Versuche wurde das Medium nach 24 h abgenommen und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

5.2.2.6 Zelluläre Fraktionierung zur Bestimmung der IL-37 Proteinmenge in den einzelnen Zellkomponenten

Für die zelluläre Fraktionierung wurden RAW-IL-37-Zellen, wie in Kapitel 5.2.2.5 beschrieben mit den *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und D39Δcps stimuliert und nach 8 h/24 h der Mediumüberstand sowie die Zellen geerntet. Im Anschluss erfolgte die Trennung der einzelnen Zellkomponenten. Dazu wurden die Zellen zunächst mit 600 µl Puffer 1 (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.4) versetzt und mit einem Zellheber vom Boden gelöst. Durch den hypotonen Puffer nehmen die Zellen das Wasser auf und platzen. Durch mehrmaliges Aufziehen des Lysates über eine 24G x 3/4“ Einmalkanüle wurde das Aufbrechen der Zellen unterstützt. Die hypotonen Bedingungen wurden anschließend durch Zugabe von 72µl 1M NaCl (Endkonzentration = 120 mM) aufgehoben. Es erfolgte eine Zentrifugation für 2 min bei 600 x g und 4°C. Der daraus resultierende Überstand wurde abgenommen und erneut bei 14000 x g für 15 min und 4°C zentrifugiert. Der nach dieser 2. Zentrifugation gewonnene Überstand enthielt die Bestandteile des Zytosols. Das Pellet, was die Kerne enthielt, wurde erneut mit 1 ml Puffer 1 versetzt, mehrmals über eine 24G x 3/4“ Einmalkanüle aufgezogen und für 3 min bei 600 x g und 4°C zentrifugiert. Das gewonnene Pellet wurde mit 0,5 ml Puffer 2 (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.4) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 2 µl Benzonase und die Inkubation des Lysates für 30 min bei RT. Durch einen letzten Zentrifugationsschritt bei 13000 x g für 15 min konnte der Überstand gewonnen werden, der die Kernbestandteile enthielt. Alle erhaltenen Proben wurden bis zur weiteren Verwendung im ELISA bei -20°C eingefroren.

5.2.3 Mikrobiologisches Arbeiten mit *S. pneumoniae*

Alle im Folgenden beschriebenen Arbeiten mit Bakterienkulturen erfolgten an einem Arbeitsplatz der Sicherheitsstufe S2 unter sterilen Bedingungen an einer Reinraumwerkbank mit autoklavierten oder heißluftsterilisierten Materialien bzw. Geräten.

5.2.3.1 Kultivierung und Aufbewahrung der *S. pneumoniae*-Stämme D39 und D39 Δ cps

Die Bakterien wurden aus einem Glyzerolstock auf Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Für Infektionsexperimente wurden am nächsten Tag Einzelkolonien mit einem sterilen Wattestäbchen in THY-Flüssigmedium (engl.: *Todd Hewitt Yeast*) überimpft (OD_{600nm} 0,03-0,06) und bis zum Erreichen der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} 0,285) bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien durch Zentrifugation bei 4500 rpm für 5 min und 4°C pelletiert und der Überstand vollständig abgesaugt. Dann wurden die Bakterien in PBS re-suspendiert und erneut zentrifugiert. Eine OD_{600nm} von 0,285 entsprach einer Konzentration von 10⁸ CFUs. Stimuliert wurde in der Regel mit einer Infektionsdosis von 1 Bakterium pro 20 Zellen (MOI 0,05). Für die Bestimmung der Phagozytose-Rate sowie der Fähigkeit der RAW-Zellen, die phagozytierten Bakterien intrazellulär abzutöten (intrazelluläres *killing*), wurde eine MOI von 150 eingesetzt. Zur Kryokonservierung wurden sämtliche Bakterien einer Übernachtskultur oder einer Flüssigkultur in der exponentiellen Wachstumsphase in Kryomedium re-suspendiert und bei -80 °C eingefroren.

5.2.3.2 Bestimmung der Phagozytose-Rate von *S. pneumoniae* durch RAW-Zellen

Für die Bestimmung der Phagozytose-Rate wurden RAW-Vektor- und RAW-IL-37-Zellen am Vortag in einer Dichte von 2 x 10⁴ Zellen/Well in 12-Well-Platten ausgesät und am Folgetag, vor der Stimulation, mit antibiotikafreiem Stimulationsmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.2.1) versetzt. Für die Infektion wurden die *S. pneumoniae*-Stämme D39 und D39 Δ cps, wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben, kultiviert, anschließend mit einer MOI von 150 auf die Zellen gegeben und für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen und mit Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.2.1) bedeckt. Nach Zugabe von 200 µg/ml Gentamycin (50 mg/ml) wurden die Zellen für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Dadurch werden extrazelluläre Bakterien, die sich auf der Oberfläche der Zellen befinden, abgetötet, ohne die eukaryotischen Zellen zu zerstören. Nach wiederholtem 2-maligen Waschen wurden die Zellen mit PBS bedeckt und mit einem Zellschaber vom Boden gelöst. Das mechanische Aufbrechen der Zellen erfolgte anschließend mit einem Gewebe-Homogenisator (FastPrep-24 SPS; MP Biomedicals). Danach wurden verschiedene

Verdünnungen des Zell-Lysates auf Columbia-Blutagar-Anzuchtplatten ausgestrichen, für 20 h bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und die entstandenen Kolonien ausgezählt. Es wurden jeweils Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Wirkung von Gentamycin wurde für jedes Experiment separat getestet, indem die Bakterien ohne Zellen mit 200 µg/ml Gentamycin (50 mg/ml) für 60 min inkubiert wurden und ein Ausstrich auf Blutagar erfolgte.

Um phagozytierte Bakterien mikroskopisch darzustellen, wurden die *S. pneumoniae*-Stämme D39 und D39Δ*cps*, wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben, kultiviert und mit 10 µl Fluoresceinisothiocyanat (FITC; 0,2 mg pro 10⁸ Bakterien) für 60 min bei RT und 150 rpm inkubiert, um die Bakterien zu markieren. Danach wurden die Bakterien 4-mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation jeweils bei 4500 rpm für 5 min und 4°C) und erst dann auf die RAW-Zellen gegeben. Anschließend erfolgten die Phagozytose sowie das Abtöten der extrazellulären Bakterien, wie im oberen Abschnitt beschrieben. Zusätzlich wurde das FITC-Signal extrazellulär anhaftender Bakterien durch Zugabe von Ethidiumbromid (1 mg/ml) blockiert. Repräsentative Bilder von phagozytierten Bakterien wurden durch eine Überlagerung mikroskopischer differentieller Interferenzkontrast-Aufnahmen mit fluoreszenzmikroskopischen Bildern des FITC-Signales intrazellulärer Bakterien aufgenommen (ZEISS Axio Vert.1).

5.2.3.3 Bestimmung der Eliminierungsrate von phagozytierten Pneumokokken (intrazelluläres *killing*) durch RAW-Zellen

RAW-Vektor- und RAW-IL-37-Zellen wurden am Vortag in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Well in 12-Well-Platten ausgesät und am Folgetag, vor der Stimulation, mit antibiotikafreiem Stimulationsmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.2.1) versetzt. Für die Infektion wurde der *S. pneumoniae*-Stamm D39Δ*cps*, wie in Kapitel 5.2.3.1 beschrieben, kultiviert, anschließend mit einer MOI von 150 auf die Zellen gegeben und für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 2-mal mit PBS gewaschen, mit Kulturmedium (Zusammensetzung siehe Kapitel 5.1.2.1) bedeckt und mit 200 µg/ml Gentamycin (50 mg/ml) für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die 60 min entsprechen den 60 min in der unten angegebenen Formel und stellen den Ausgangswert der Berechnung dar, wo noch keine Bakterien abgetötet waren. In einem Intervall von 120 min, 180 min und 240 min nach der Stimulation wurden die Zellen dann lysiert, ausplattiert und inkubiert. Folgende Formel wurde für die Berechnung der Fähigkeit zum intrazellulären *killing* verwendet:

Für Versuche mit rekombinanten IL-37 (R&D) wurden ausschließlich RAW-Vektor-Zellen verwendet, die für 4 h mit 100 µg/ml rekombinanten IL-37 vor-inkubiert wurden bzw. unbehandelt blieben, bevor sie mit D39*Acps* stimuliert wurden.

5.2.4 Molekularbiologische Methoden

5.2.4.1 Isolierung von RNA aus Zellen

Um die Menge an Boten-RNA (mRNA) eines bestimmten Gens zu quantifizieren, wurde zunächst die gesamte RNA aus 5×10^6 Zellen isoliert. Dabei wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen mit 350 µl RLT-Puffer (Quiagen) versetzt, abgeschabt und das Gemisch 20-30 mal re-suspendiert. Aus dem Lysat wurde die RNA anschließend mittels des RNeasy mini Kits (Qiagen) isoliert und genomische DNA mit DNaseI auf der Säule laut Herstellerangaben abgebaut.

5.2.4.2 Isolierung von RNA aus Lungengewebe

Zur Isolation von Gesamt-RNA aus dem Lungengewebe wurden die mit 600 µl RLT-Puffer (Quiagen) versetzt. Der mechanische Aufschluss des Gewebes erfolgte in speziellen *Lysing-Matrix-Tubes* (MP Biomedicals) mittels eines Gewebe-Homogenisators (FastPrep-24 SPS; MP Biomedicals). Das Homogenisat wurde anschließend in 2 ml-Tubes überführt und für 5 min bei 16000 x g zur Entfernung von Zellbruchstücken abzentrifugiert. Die RNA-Extraktion aus dem Überstand wurde mittels des RNeasy mini Kits (Qiagen) vorgenommen und genomische DNA mit DNaseI auf der Säule abgebaut, den Angaben des Herstellers folgend.

5.2.4.3 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Unter Verwendung des „NanoDrop D-1000 Spectrophotometers“ (Thermo Fisher Scientific, Inc.) wurde die Konzentration gereinigter RNA anhand der optischen Dichte bei 260 nm bestimmt. Des Weiteren werden die Quotienten aus den Absorptionswerten bei 200 und 280 nm sowie 260 und 230 nm von der Software berechnet. Der erstgenannte Wert erlaubt Rückschlüsse auf eine mögliche Kontamination mit Proteinen oder anderen im Bereich von 280 nm stark absorbierenden Substanzen. Der zweite Wert liefert Aussagen

über Verunreinigungen mit Pufferkomponenten, Phenol oder Detergentien. Bei hoher Reinheit der RNA-Proben liegen beide Quotienten um 2,0 oder darüber. Niedrige Werte deuten auf Verunreinigungen hin, die nachfolgende Analysen beeinträchtigen können. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80 °C aufbewahrt.

5.2.4.4 Reverse Transkription (RT)

Um ausgewählte Gene durch *real-time* quantitative PCR (qPCR) validieren zu können, wurde zunächst mittels Reverser Transkription (RT) von 2 µg RNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl komplementäre DNA (cDNA) synthetisiert, wofür das „High Capacity cDNA Reverse Transkription Kit“ (RT-Kit) von Applied Biosystems entsprechend der Herstellerangaben verwendet wurde. Die Zusammensetzung des Ansatzes ist in Tabelle 6 aufgeführt. Als Negativkontrolle wurde ein Ansatz mit 5 µg RNA in A. dest., ohne RT-Kit mitgeführt (RT-Kontrolle), um die Kontamination der Probe mit genomischer DNA überprüfen zu können. Die Reaktion erfolgte im S1000™ Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories) nach einer 10-minütigen Inkubation bei 25°C für 2 h bei 37°C und wurde durch 5-minütiges Erhitzen bei 85°C beendet. Die cDNA wurde durch Zugabe von 130 µl 0,5x TE Puffer verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

Tabelle 6: Komponenten für die reverse Transkription

Komponente	Volumen pro Reaktion
10 x Puffer	2 µl
dNTPs	0,8 µl
10 x Random Primer	2 µl
RNase Inhibitor	1 µl
Reverse Transkriptase (RT)	1 µl
RNA verdünnt in H ₂ O	2 µg RNA (Gesamtvolumen 13,2 µl RNA/H ₂ O-Gemisch)

5.2.4.5 *real-time* quantitative PCR (qPCR)

Die *real-time* qPCR ist eine Vervielfältigungsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) beruht, und zusätzlich die Quantifizierung der gewonnenen DNA ermöglicht. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus in Echtzeit (engl.

real time) erfasst werden. Dabei werden fluoreszierende Reporterfarbstoffe verwendet (hier SYBR Green I), die in doppelsträngige DNA interkalieren. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der PCR-Produkte zu. Am Ende eines Laufs (der aus mehreren Zyklen besteht) wird anhand von erhaltenen Fluoreszenzsignalen die Quantifizierung in der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur in der exponentiellen Phase der PCR (die wenige Zyklen in einem Lauf dauert) ist die korrekte Quantifizierung möglich, da während dieser Phase die optimalen Reaktionsbedingungen herrschen.

In dieser Arbeit wurde für die qPCR das Gerät „Corbett Rotor-Gene 6000“ verwendet. Die Ansätze wurden mit dem Roboter „CAS-1200“ pipettiert und jede Probe wurde in Duplikaten gemessen. Um die Effizienz des DNA-Verbaus während der RNA-Extraktion zu überprüfen, wurde die RT-Negativkontrolle verwendet. Die PCR erfolgte mit einem Reaktionsvolumen von insgesamt 20 µl (10 µl 2 x SensiMix SYBR Master Mix; 0,4 µM forward Primer; 0,4 µl reverse Primer; 4 µl cDNA; 5,2 µl RNase- und DNase-freies H₂O) stets nach dem gleichen Protokoll (Tabelle 7).

Die Spezifität der Primerpaare wurde anhand der Schmelzkurvenanalyse überprüft. Die Effizienz der Primerpaare wurde anhand einer seriellen Verdünnung des Templates per qPCR verifiziert.

Für die Analyse der relativen Expression der Ziel-Gene wurde die „Pfaffl Methode“ (Pfaffl et al. 2004, Pfaffl et al. 2002, Pfaffl 2001) angewendet. Als Ausgangsdaten für die Berechnung der *log2 fold changes* wurden die bei Abschluss der real-time qPCR-Analyse erhaltenen CT-Werte (engl.: *Cycle threshold*) und Primereffizienzen herangezogen. Dabei wurde das Expressionslevel auf den geometrischen Mittelwert der Expression des Haushaltsgenes m-Ribosomal protein-L13A (engl.: *Housekeeping genes*) normalisiert. Haushaltsgene sind nicht-regulierte Gene, die konstitutiv exprimiert werden. Die Stabilität der Expression dieser Haushaltsgene wurde mit dem „BestKeeper Algorithmus“ (Pfaffl et al. 2004) kalkuliert. Anschließend erfolgte die Kalkulation der *log2 fold changes* für die Ziel-Gene zur Bewertung der transkriptionellen Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen.

Tabelle 7: Zeit- und Temperaturprotokoll der *real-time* qPCR

Schritt	Reaktionsbedingungen	Funktion
1	95°C, 10 min	Hitzeaktivierung der DNA-Polymerase
2	95 °C, 15 sec	Denaturierung von cDNA und Primern
3	60 °C, 20 sec	Primer-Annealing
4	72 °C, 20 sec	Elongation

5	45 Zyklen, Wdh. Schritte 2-4	Amplifizierung des PCR-Produktes
6	72 °C, 90 sec	Übergang zur Schmelzkurve
7	72 °C → 95 °C, 1 °C alle 3 sec	Schmelzkurvenanalyse
8	Abkühlen auf 4 °C	Beendigung des PCR-Programmes

5.2.4.6 Primerdesign für *real-time* qPCR

In Vorbereitung der *real-time* qPCR werden Primer benötigt, die spezifisch an die Transkripte der zu untersuchenden Gene binden und so eine spezifische Analyse auf Genexpressionsniveau möglich machen. Dafür wurden die Transkriptsequenzen der zu untersuchenden Gene über die „Ensembl“-Datenbank (<http://www.ensembl.org/index.html>) ermittelt. Auf Grundlage dieser Sequenzen erfolgte die Konstruktion passender Primer (Tabelle 2) mit Hilfe des im Internet verfügbaren „primer-BLAST tool“ des „National Center for Biotechnology Information“ (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Dabei werden die Basensequenz des Primerpaares mit einer Sequenzdatenbank der Zielspezies verglichen und Sequenzen mit ähnlicher Basenabfolge identifiziert. Eventuelle Sekundärstrukturen des PCR-Produktes wie Haarnadelschleifen, Homo- und Heterodimere wurden durch Analyse der Nukleotidsequenz anhand des „Mfold Algorithmus“ (Zuker 2003) ausgeschlossen. Sind diese Strukturen zu stabil, wird der Primer während der PCR in seiner Bindung an den Matrizenstrang gestört, was eine verfälschte Genexpressionsanalyse zur Folge hat.

Die Primer werden kommerziell synthetisiert und geliefert (Eurofins Genomics). Rekonstitution und Konzentrationseinstellung (100 µM) erfolgten mit RNase-freiem A. dest (Ambion GmbH, Life Technologies) nach Herstellerangaben. Aus den so erhaltenen Primer-Stocklösungen wurden Primer-Gebrauchslösungen (10 µM) durch eine 1:10 Verdünnung mit RNase-freiem A. dest (Ambion GmbH, Life Technologies) hergestellt und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C aufbewahrt.

5.2.4.7 Semiquantitative PCR

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR, engl.: *polymerase chain reaction*) kann eine definierte DNA-Sequenz *in vitro* amplifiziert werden. Die Reaktion basiert auf drei Teilschritten: der thermischen Denaturierung der DNA-Matrize, der Hybridisierung eines spezifischen Oligonukleotids (des Primers) mit der Matrize und der Synthese eines komplementären DNA-Stranges zwischen den Primern mit Hilfe einer thermostabilen

Polymerase (Elongation). Durch eine zyklische Wiederholung der Teilschritte wird die gewünschte Sequenz exponentiell vervielfältigt. Anschließend können die DNA-Fragmente aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren in einem Agarosegel elektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden. Das im Agarosegel enthaltene Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, die dadurch aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften des Ethidiumbromids unter UV-Licht sichtbar gemacht werden kann.

Bei der semiquantitativen PCR wurde die cDNA (5µl/Reaktionsansatz) unter Verwendung von „Taq DNA Polymerase“ (5-Prime) amplifiziert (25 µl Gesamtvolumen/Reaktionsansatz).

Die PCR-Konditionen sind in Tabelle 8 angegeben. Die PCR-Produkte wurden in einem mit Ethidiumbromid gefärbten 2%-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und mit einem UV-Transiluminator („Fusion Fx7“, PeQlab Biotechnologie GmbH) sichtbar gemacht.

Tabelle 8: PCR-Konditionen für die semiquantitative PCR

Schritt	Dauer	Temperatur
Aktivierung der Taq-Polymerase	3 min	94 °C
Denaturierung	30 sec	94 °C
Hybridisierung	30 sec	60 °C
Elongation	30 sec	72 °C
Wiederholung des Zyklus ab Denaturierung; Anzahl der Zyklen abhängig von der Ziel cDNA		
Elongation	10 min	72 °C

5.2.5 Immunologische Nachweismethoden

5.2.5.1 Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (ELISA)

Der ELISA (engl.: *Enzyme-linked immunosorbent assay*) ist ein immunologisches, antikörperbasiertes Nachweisverfahren, das im Rahmen dieser Arbeit zur Quantifizierung von Zytokinen aus Zellkulturüberständen sowie aus Serum, BAL und Lungenhomogenisaten von infizierten und uninfizierten WT- und IL-37tg-Mäusen verwendet wurde. Die Lunge musste vor der Verwendung im ELISA mittels des „Cell Lysis Kit“ (BIO-RAD) entsprechend der Herstellerangaben lysiert werden. Zellkulturüberstände, Serum und BAL unverdünnt in einem Volumen von 100µl/Well

eingesetzt. Von den Lungenhomogenisaten wurden pro Probe 100 µg in einem Volumen von 100µl/Well verwendet.

Beim ELISA wird zunächst der Boden einer Testplatte mit einem spezifischen Antikörper gegen die Zielstruktur beschichtet. Darauf wird die Probe gegeben, aus dem das Antigen gebunden und so auf dem Plattenboden immobilisiert wird. Nachdem der restliche Kulturüberstand von der Platte gewaschen wurde, wird ein zweiter Antikörper zugegeben, der ebenfalls spezifisch an das Antigen bindet und der an eine Peroxidase gekoppelt ist. Die Peroxidase kann anschließend das Substrat TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin) enzymatisch zu einem blauen Reaktionsprodukt umsetzen, dessen Menge photometrisch bestimmt wird. Die Farbintensität ist dabei proportional zur Menge an Antigen, dass auf diese Weise mit Hilfe einer Standardkurve quantifiziert werden kann.

Für die Messung von IL-6, IL-1β und TNF-α wurden „Nunc-Immuno™ MaxiSorp™ 96-Well-Flachbodenplatten“ (VWR International) und die Kits „Mouse IL-6; IL-1β; TNF-α ELISA Ready-Set-Go“ (eBioscience) entsprechend der Herstellerangaben verwendet. Für die Messung von IL-37 wurde das Kit „IL-37 (human) ELISA Kit“ (AdipoGen) genutzt. Die Adsorptionen wurden im Plattenlesegerät „Infinite M200“ von Tecan gemessen.

Die Analyse der gemessenen Adsorptionen und die Berechnung der daraus resultierenden Zytokinkonzentrationen wurden mit Hilfe der Software „Magellan 6.6“ durchgeführt. In den dargestellten Diagrammen wurden die Mittelwerte von mindestens drei unabhängigen Experimenten zusammengefasst (Mittelwert ± Standardabweichung). Für das Erstellen der Diagramme und die statistische Analyse wurde die Software „Prism 5.0“ von GraphPad verwendet.

5.2.5.2 Multiplex-ELISA

Ziel des Multiplex-ELISAs ist es, mehrere Zielproteine in einer Probe zeitgleich zu quantifizieren. Dabei wurden im Rahmen dieser Arbeit Serum, BAL und Lungenhomogenisate von infizierten und uninfizierten WT- und IL-37tg-Mäusen eingesetzt und der Versuch mit dem Multiplex-Elisa Kit „Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Group I; 9-plex Assay“ (BIO-RAD) durchgeführt. Die zu untersuchenden Analyten umfassen IL-6, IL-1β, TNF-α, KC, IFN-γ, MCP-1, G-CSF, und IL-10. Zur Durchführung des Multiplex-ELISAs wurden in eine schwarze 96-Well Flachboden-Platte (eBioscience) je 50 µl *Coupled Magnetic Beads* gegeben und 50 µl Probenvolumen hinzugefügt. Die BAL wurde dabei unverdünnt, das Serum 1:2 verdünnt und je 100 µg Lungenhomogenisat eingesetzt. Es folgte eine Inkubation der Mischung über Nacht bei 4°C auf einem

Thermomixer MTP (Eppendorf). Bei Raumtemperatur wurde nun der *Cytokine Detection Antibody Mix* hinzugegeben. Die so entstandenen Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplexe wurden nun mit Streptavidin-PE markiert. Das Streptavidin bindet an den *Detection Antibody* und verstärkt das Signal, wogegen PE das gebundene Fluorophor darstellt. Mit dem *BioPlex 200TM System, powered by Luminex xMAP Technology* (Bio-Rad Laboratories) wurde die Platte ausgelesen. Hier wurden die Beads aufgezogen und mit zwei Lasern analysiert. Ein Laser bestimmt den Zielanalyt der Beads, wogegen der andere das Ausmaß des Fluoreszenzsignals ermittelt und somit die Menge des Zielproteins bestimmt. Die exakte Quantifizierung erfolgte mittels integrierter Software. Hier wurden die Rohdaten auf eine Standardkurve des mitgeführten Standards bezogen, um die Konzentration der einzelnen Zielproteine in der Probe zu bestimmen. Alle Proben, wie auch der Standard wurden als Duplikate aufgetragen. Die exakte Durchführung des Verfahrens richtete sich strikt nach dem Protokoll des Herstellers.

5.2.6 Statistik

Für die grafische Darstellung der gewonnenen Daten sowie die statistische Analyse wurde die Software „Prism5.0“ von GraphPad verwendet. Signifikanzen zwischen zwei Gruppen (WT Mäuse vs. IL-37tg Mäuse; RAW-Vektor Zellen vs. RAW-IL-37 Zellen) wurden mit dem zweiseitigen t-Test ermittelt. Die Kurven der Überlebenszeitanalyse wurden durch den *Logrank-Test* miteinander verglichen. Die Beurteilung der Signifikanz des Expressionslevels der IL-37 mRNA sowie des IL-37 Proteins (IL-37tg Mäuse; RAW-IL-37 Zellen) erfolgte mittels „einseitigem One-way ANOVA Test“ gefolgt vom „*Dunnnett's Multiple Comparison Test*“ (Dunn test). Ein p-Wert < 0,05 wird als signifikant angenommen. Signifikanzen wurden folgendermaßen gekennzeichnet: p < 0,05 (*); p < 0,005 (**); p < 0,0005 (***); p < 0,0001 (****) und p > 0,05 (ns = nicht signifikant).

6 Ergebnisse

6.1 Das Expressionsprofil von IL-37 in RAW-Zellen und dessen Auswirkungen

auf die induzierte Immunantwort nach Stimulation mit *S. pneumoniae*

6.1.1 *S. pneumoniae* induziert die Expression von IL-37 mRNA in RAW-Zellen

Um das Expressionsmuster von IL-37 in RAW-Zellen als Folge einer Stimulation mit *S. pneumoniae* zu analysieren, wurden RAW-IL-37-Zellen mit den *S. pneumoniae*-

Stämmen D39 und D39 Δ cps (MOI: 0,05) sowie dem TLR2-Agonisten MALP-2 (0,1 μ g/ml) für 2 h, 4 h, 6 h und 8 h stimuliert und die Menge an IL-37 mRNA mittels qPCR gemessen (Abbildung 8). Da MALP-2 dafür bekannt ist, die Immunreaktion und die damit verbundene Induktion von Chemokinen und Zytokinen durch die Aktivierung von Makrophagen als Antwort auf eine Infektion mit grampositiven Bakterien zu vermitteln (Borrello et al. 2011, Kaufmann et al. 1999, Muhlradt et al. 1991) wurde es als Positivkontrolle eingesetzt. Unstimulierte Zellen wurden als Kontrollen mitgeführt.

In unstimulierten RAW-Zellen, die stabil mit IL-37 transfiziert sind, ist der CMV-Promotor konstitutiv aktiv, sodass IL-37 stets in geringen Mengen exprimiert wird. Es steigt erst nach Stimulation der Zellen mit LPS signifikant an (Nold et al. 2010). Ein ähnliches Expressionsprofil von IL-37 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden. Während in unstimulierten RAW-IL-37-Zellen nur geringe Mengen an IL-37 mRNA vorhanden waren (Daten nicht gezeigt), zeigte die Stimulation der Zellen mit D39, D39 Δ cps und MALP-2 einen signifikanten Anstieg der Expression von IL-37 (Abbildung 8). Dabei verlaufen die Expressionsprofile von IL-37 in RAW-Zellen, abhängig vom Stimulus, zeitlich gegenläufig. Während MALP-2 bereits nach 2 h einen signifikanten Anstieg der IL-37 mRNA-Menge induzierte, die sich im weiteren zeitlichen Verlauf kontinuierlich verringerte, konnte bei *S. pneumoniae* erst nach 4 h eine signifikante Expression beobachtet werden, die bis zum 8 h-Zeitpunkt stetig anstieg. Dies war vor allem bei D39 Δ cps zu beobachten (Abbildung 8).

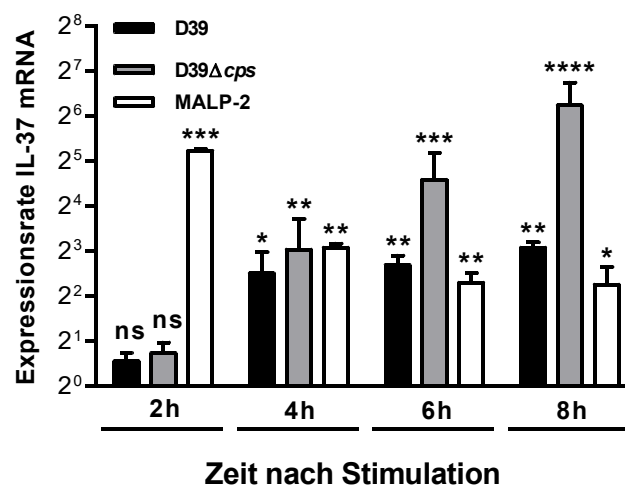


Abbildung 8: Analyse der Genexpression von IL-37 in RAW-Zellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae* RAW-IL-37-Zellen wurden mit den *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und D39 Δ cps (MOI: 0,05) sowie mit dem TLR2-Agonisten MALP-2 (0,1 μ g/ml) stimuliert. Gezeigt ist das IL-37

mRNA Expressionsprofil 2 h, 4 h, 6 h und 8 h nach Stimulation. Die Analyse erfolgte mittels qPCR. Expressionsrate = vielfache Expression relativ zu unstimulierten Zellen. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung von $n = 3$ unabhängigen Experimenten. ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$; **** $p < 0,0001$.

6.1.2 Das IL-37 Protein akkumuliert im Zellkern und im Zytosol der RAW-Zellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae*

In einem nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob und in welchem Umfang aus der gebildeten IL-37 mRNA das Protein synthetisiert wird. Da eine vorausgegangenen Studie gezeigt hat, dass sich IL-37 vorrangig im Zellkern und im Zytosol anreichert, wenn stabil transfizierte RAW-Zellen mit LPS stimuliert wurden (Sharma et al. 2008), sollte in dieser Arbeit zudem überprüft werden, ob das IL-37 Protein nach Stimulation mit *S. pneumoniae* sekretiert wird und im Zellkulturüberstand zu finden ist oder ob es innerhalb der Zelle akkumuliert. Dafür wurden RAW-IL-37-Zellen zunächst mit D39 und D39 Δ cps (MOI: 0,05) sowie MALP-2 (0,1 μ g/ml) für 24 h stimuliert. Anschließend erfolgte eine zelluläre Fraktionierung, bei der die einzelnen Zellkomponenten voneinander getrennt werden. Die in den einzelnen Zellkomponenten enthaltene IL-37 Protein-Menge wurden in einem letzten Schritt mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 9).

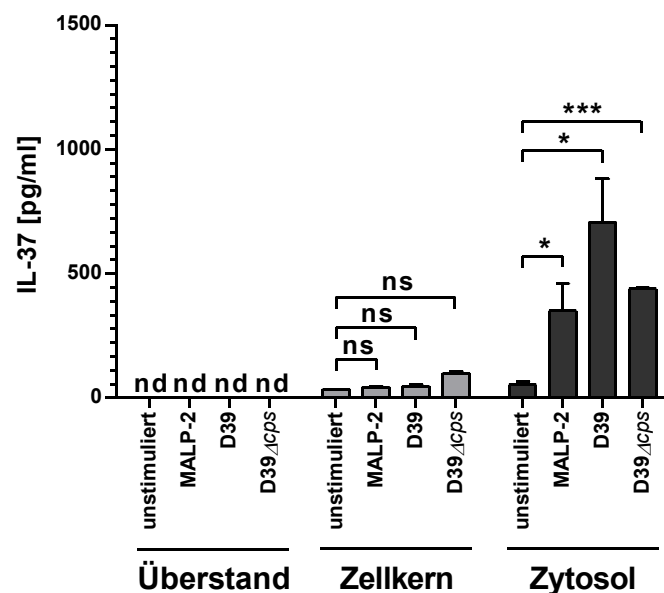


Abbildung 9: Detektion des IL-37 Proteins im Zellkulturüberstand, Zellkern und Zytosol der RAW-Zellen RAW-IL-37-Zellen (15×10^6 /10cm Zellkulturschale) wurden mit den *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und D39 Δ cps (MOI: 0,05) sowie mit dem TLR2-Agonisten MALP-2 (0,1 μ g/ml) für 24 h stimuliert und die Menge an IL-37 Protein im Zellkulturüberstand, Zellkern und Zytosol

mittels ELISA bestimmt. Detektionslimit = 15 pg/ml. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardabweichungen von n = 3 unabhängigen Experimenten dargestellt. nd = nicht detektiert; ns = nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005.

Es konnte beobachtet werden, dass weder MALP-2 noch die beiden *S. pneumoniae*-Stämme D39 und D39 Δ cps zu einer Sekretion und somit Ausschleusung von IL-37 Protein aus der Zelle führen, was sich durch nicht nachweisbares Protein im Zellkulturüberstand zeigt. Hingegen konnten im Zellkern geringe Mengen und im Zytosol eine signifikante Induktion des IL-37 Proteins bei allen drei Stimuli detektiert werden.

Das IL-37 Protein wird demnach in RAW-Zellen aus der gebildeten mRNA synthetisiert, wird aber nicht sekretiert sondern akkumuliert in der Zelle.

6.1.3 Die Phagozytose-Rate von *S. pneumoniae* durch RAW-Zellen bleibt durch IL-37 unbeeinflusst, während die intrazelluläre Eliminierung der Pneumokokken eingeschränkt ist

Als Zellen des Immunsystems liegt die Hauptaufgabe der Makrophagen darin, eingedrungene Mikroorganismen durch Phagozytose zu eliminieren (Hof 2005). Deshalb wurde in einem nächsten Schritt untersucht, ob IL-37 bei den RAW-Zellen einen Einfluss auf die Phagozytose-Rate sowie die intrazelluläre Eliminierung (intrazelluläres *killing*) der aufgenommenen Pneumokokken hat. Da erste Ergebnisse zeigten, dass IL-37 nach der Stimulierung von RAW-Zellen mit *S. pneumoniae* innerhalb der Zelle akkumuliert und nicht nach Außen abgegeben wird, sollte zudem überprüft werden, ob intrazelluläres und extrazelluläres IL-37 unterschiedliche Auswirkungen auf die Eliminierung der aufgenommenen Pneumokokken haben. Da Vorversuche ergeben haben, dass D39, im Gegensatz zu D39 Δ cps, nur in sehr geringem Maße von den RAW-Zellen phagozytiert wird (Daten nicht gezeigt), wurde für die Versuche nur D39 Δ cps verwendet. In einem ersten experimentellen Ansatz wurden RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen mit D39 Δ cps (MOI: 150) für 60 min stimuliert. Nach der Tötung extrazellulärer Bakterien durch Gentamycin und anschließender Lyse der Zellen wurden die intrazellulären Bakterien auf Blutagar-Platten ausgestrichen. Die gewachsenen Kolonien wurden nach einer Inkubation von 24 h, 37°C und 5% CO₂ ausgezählt und somit die Rate der phagozytierten, vitalen Pneumokokken ermittelt. Daraus ergab sich, dass RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen eine ähnlich hohe Phagozytose-Rate aufwiesen, was sich in einer annähernd gleichen Anzahl von aufgenommenen Pneumokokken zeigte (Abbildung 10B). Abbildung 10A zeigt repräsentative Bilder FITC-gelabelter, phagozytierter Pneumokokken.

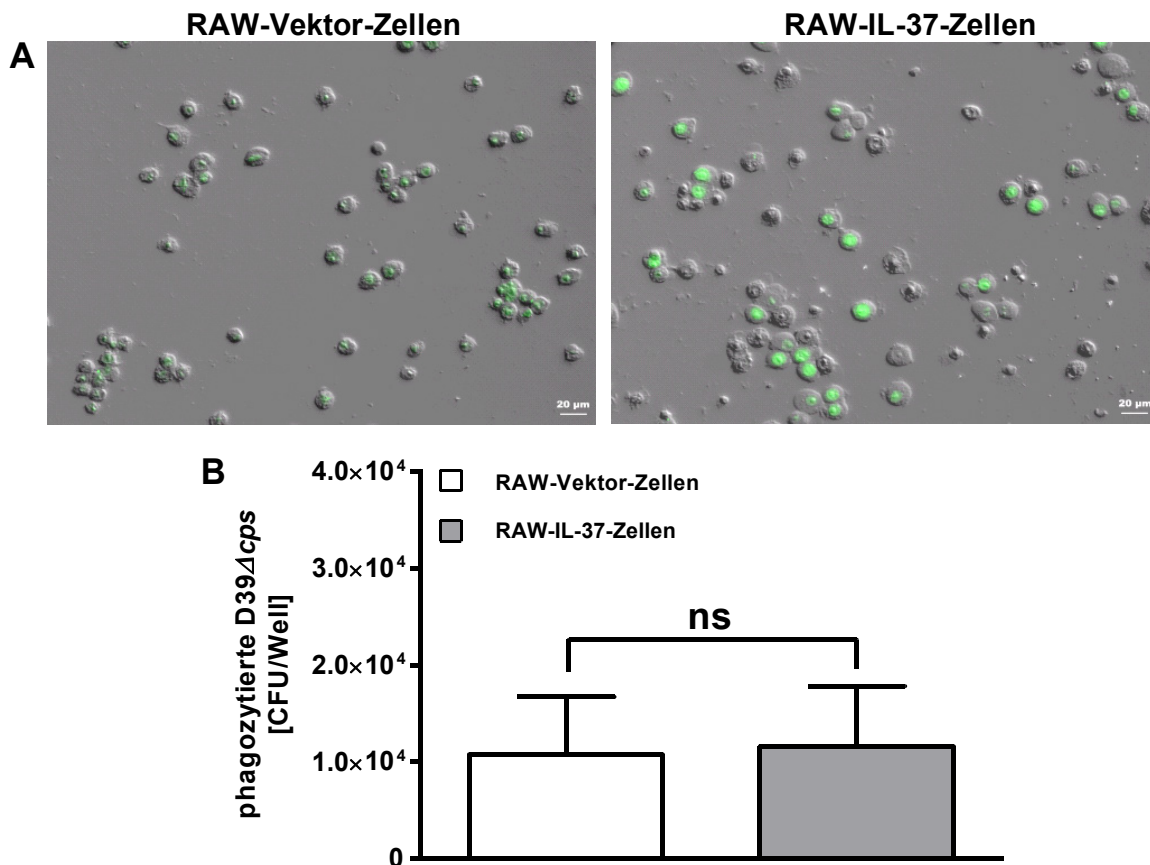


Abbildung 10: Vergleich der Phagozytose-Rate von *S. pneumoniae* durch RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen wurden mit D39Δcps (MOI: 150) stimuliert. **(A)** Die Bakterien wurden vor der Stimulierung der Zellen FITC-markiert. Das FITC-Signal extrazellulär anhaftender Bakterien wurde durch Zugabe von Ethidiumbromid (1mg/ml) blockiert. Überlagerung mikroskopischer differentieller Interferenzkontrast-Aufnahmen mit fluoreszenzmikroskopischen Bildern des FITC-Signales intrazellulärer Bakterien 60 min nach der Stimulation. Die Bilder sind repräsentativ für n = 3 unabhängige Experimente. **(B)** Vergleich der Menge an phagozytierten Pneumokokken in RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen 60 min nach der Stimulation. Extrazelluläre Bakterien wurden zuvor für 1 h mit Gentamicin (200 μg/ml) behandelt und abgetötet. Die Daten repräsentieren die ausgezählten CFUs/Well und sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt. n = 3 unabhängige Experimente, Durchführung im Duplikat. ns = nicht signifikant.

In einem zweiten experimentellen Ansatz wurden entweder RAW-Vektor-Zellen und RAW-IL-37-Zellen mit D39Δcps (MOI: 150) oder RAW-Vektor-Zellen zunächst mit rekombinantem IL-37 vorinkubiert und anschließend mit D39Δcps (MOI: 150) über einen Zeitraum von bis zu 240 min stimuliert. Nach anschließender Lyse der Zellen und

Ausstrich der intrazellulären, vitalen Pneumokokken auf Blutagar-Platten, wurden die gewachsenen Kolonien nach einer Inkubation von 24 h, 37°C und 5% CO₂ für die Zeitpunkte 120 min, 180 min und 240 min nach Stimulation ausgezählt und die Effizienz des intrazellulären *killings* bewertet. Die Ergebnisse zeigen, dass intrazelluläres IL-37 die Fähigkeit der RAW-Zellen, aufgenommene Pneumokokken zu eliminieren, bei langer Inkubation von 240 min verringert, während extrazelluläres IL-37 zu keinem Zeitpunkt einen Einfluss auf das intrazelluläre *killing* der RAW-Zellen hat. Im Speziellen wiesen RAW-IL-37-Zellen nach 240 min noch 55% lebende, intrazelluläre Pneumokokken im Vergleich zu den RAW-Vektor-Zellen auf, bei denen nur noch 25% vitale Bakterien in den Zellen detektiert werden konnten (Abbildung 11A). RAW-Vektor-Zellen, die mit rekombinanten IL-37 vorinkubiert und anschließend stimuliert wurden, zeigten im Vergleich zu RAW-Vektor-Zellen, die nicht vorinkubiert wurden, keinen Unterschied (Abbildung 11B).

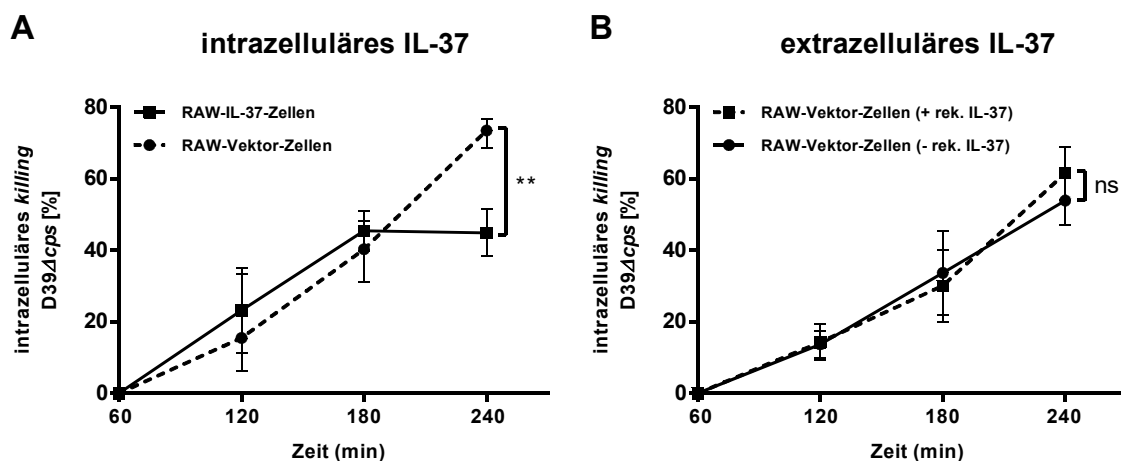


Abbildung 11: Intrazelluläres *killing* phagozytierter Pneumokokken in RAW-Zellen (A) RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen wurden mit D39Δcps (MOI: 150) für 60 min stimuliert, anschließend für 1 h mit Gentamicin (200 µg/ml) behandelt und dann nach 120, 180 oder 240 min lysiert und die intrazellulären, vitalen Pneumokokken auf Blutagar-Platten ausplattiert. **(B)** RAW-Vektor-Zellen wurden für 4 h mit rekombinantem IL-37 in einer Konzentration von 100 µg/ml vor-inkubiert oder blieben unbehandelt. Anschließend erfolgte wie unter (A) beschrieben die Stimulation und Lyse der Zellen. Die Daten in (A) und (B) sind dargestellt als prozentualer Anteil der abgetöteten Pneumokokken relativ zu 60 min nach der Stimulation, dessen errechnete CFU den Ausgangswert für die Berechnung darstellen und 0% abgetöteter Pneumokokken entsprechen. Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

n = 3 unabhängige Experimente, Durchführung im Duplikat. ns = nicht signifikant, **p < 0,005. Die Daten sind als Mittelwerte mit Standardabweichung dargestellt.

6.1.4 IL-37 reprimiert die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine

Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, welche immunmodulatorischen Effekte IL-37 nach einer Stimulation von RAW-Zellen mit *S. pneumoniae* hervorruft. Dafür wurde die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β von RAW-Vektor- und RAW-IL-37-Zellen, welche zuvor mit D39 und D39 Δcps (MOI: 0,05) sowie MALP-2 (0,1 μ g/ml) stimuliert wurden, miteinander verglichen.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass IL-37 die Sekretion von IL-6, TNF- α und IL-1 β nach allen drei Stimuli reprimiert, was sich in signifikant niedrigeren Protein-Mengen der Zytokine in den RAW-IL-37-Zellen verglichen mit den RAW-Vektor-Zellen zeigt (Abbildung 12). In den unstimulierten Zellen zeichnete sich kein signifikanter Unterschied ab (Abbildung 12). IL-37 wirkt demnach in den RAW-Zellen in Folge einer Stimulation mit *S. pneumoniae* immunsupprimierend.

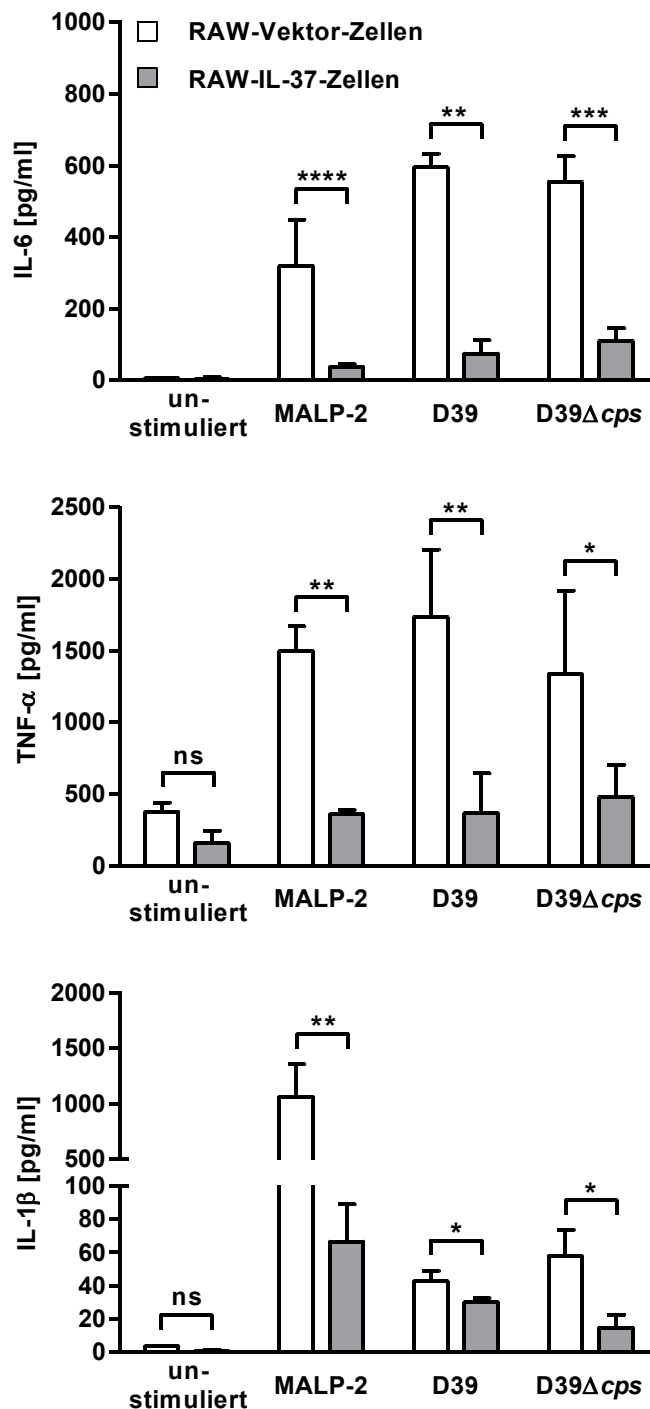


Abbildung 12: Der Einfluss von IL-37 auf die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine
 RAW-Vektor-Zellen und RAW-IL-37-Zellen wurden mit den *S. pneumoniae*-Stämmen D39 und D39Δcps (MOI: 0,05) sowie mit dem TLR2-Agonisten MALP-2 (0,1 µg/ml) stimuliert. Es erfolgte anschließend die Quantifizierung der Protein-Menge von IL-6, IL-1β und TNF-α im Zellkulturüberstand 24 h nach Stimulation von 5×10^6 Zellen/Well mittels ELISA. Detektionslimit = 15 pg/ml für IL-6 und TNF-α sowie 31 pg/ml für IL-1β. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen von n = 3 unabhängigen Experimenten. ns = nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001.

6.2 IL-37 wird als Folge einer Infektion mit *S. pneumoniae* in IL-37tg-Mäusen exprimiert und sekretiert

IL-37 dämpft bei einer Vielzahl von Erkrankungen das entzündliche Geschehen ein und verbessert somit den Krankheitsverlauf (Teng et al. 2014, Ye et al. 2015a, Ye et al. 2014a, McNamee et al. 2011, Sakai et al. 2012, Ballak et al. 2014, Lunding et al. 2015, Xu et al. 2015, Wu et al. 2013, Coll-Miro et al. 2016).

Anknüpfend an die *in vitro*-Versuche, die in Kapitel 6.1 beschrieben wurden, sollte anschließend der Einfluss von IL-37 auf das Immunsystem nach einer Infektion mit *S. pneumoniae in vivo* analysiert werden. Durch vorangegangene Dosisfindungsversuche, bei denen 5×10^6 , 5×10^7 5×10^8 CFU/Maus miteinander verglichen wurden, konnte die optimale Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus ermittelt werden. Bei dieser Bakterienkonzentration zeigten sich signifikante Unterschiede hinsichtlich der Suszeptibilität von WT-Mäusen und IL-37tg-Mäusen. Darüber hinaus wurde mit dieser Bakterienkonzentration ein Krankheitsverlauf bei den Tieren hervorgerufen, der nicht zum unmittelbaren Tod führte, sondern mit der im geeigneten zeitlichen Rahmen eine LD₉₀ erreicht werden konnte.

Da eine Infektion mit *S. pneumoniae* zu dem schweren Krankheitsbild der Pneumokokken-Pneumonie führen kann, bei der sich als ernste Komplikation eine Bakteriämie mit Sepsis entwickeln kann, wurde in einem ersten Schritt untersucht, ob IL-37 nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* in Lunge, BAL und Blut exprimiert wird und als Protein in den genannten Kompartimenten akkumuliert bzw. zirkuliert. Dafür wurden IL-37tg-Mäuse mit dem

S. pneumoniae-Stamm D39 mit einer Konzentration von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert. Uninfizierte Tiere, die als Kontrollgruppen mitgeführt wurden, erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS. Anschließend wurden 8 h, 24 h und 48 h nach der Infektion Lunge, BAL und Blut entnommen und auf das Vorhandensein von IL-37 mRNA und IL-37 Protein analysiert (Abbildung 13).

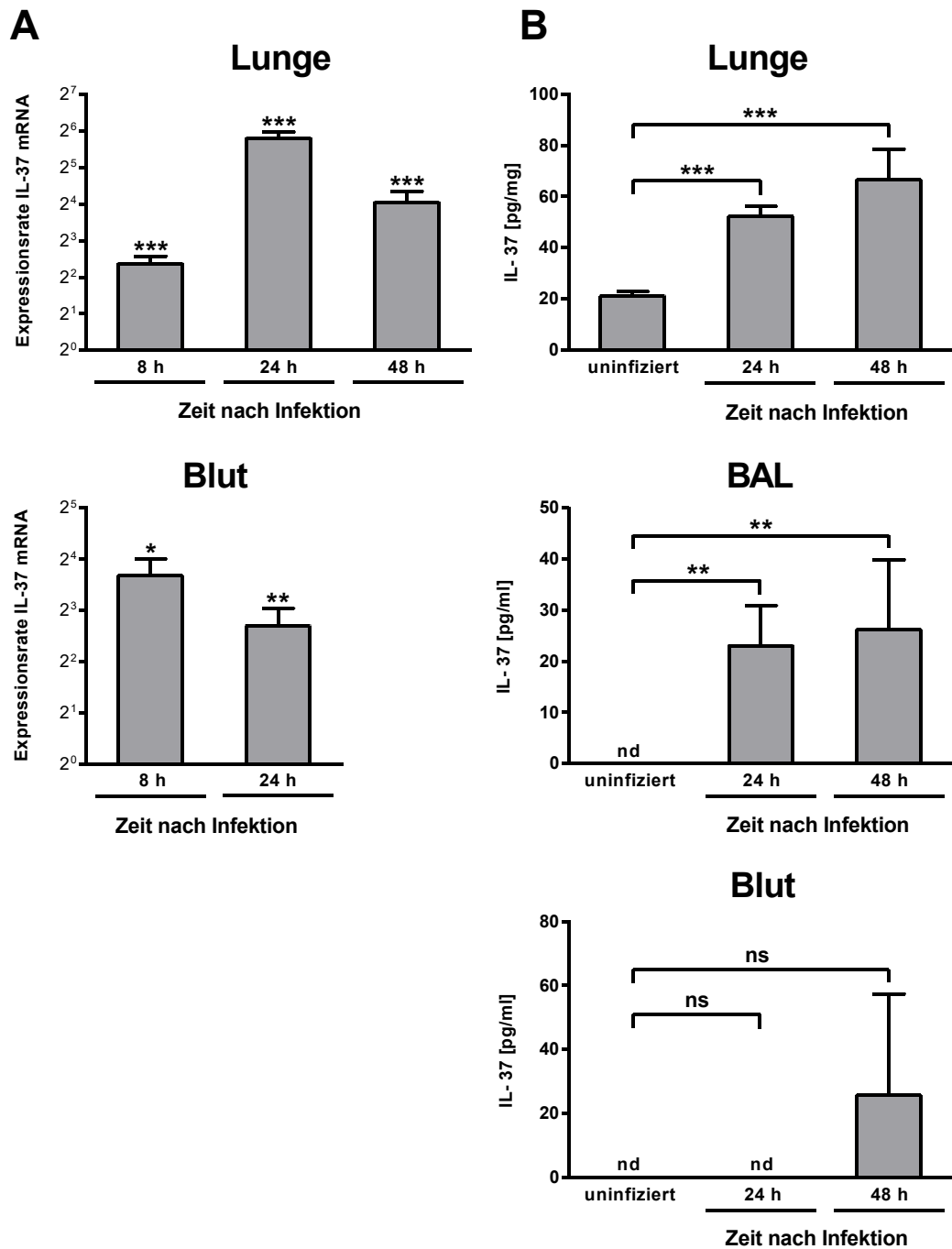


Abbildung 13: Analyse der mRNA- und Protein-Menge von IL-37 in Lunge, BAL und Blut nach Infektion von IL-37tg-Mäusen mit *S. pneumoniae* IL-37tg-Mäuse wurden intranasal mit D39 mit einer Konzentration von 5×10^7 CFU/Maus infiziert. Uninfizierte Tiere, die als Kontrollgruppen mitgeführt wurden, erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS. **(A)** IL-37 mRNA Expressionsrate in der Lunge (8 h, 24 h, 48 h nach Infektion) sowie im Blut (8 h und 24 h nach Infektion). Die Analyse erfolgte mittels qPCR. Expressionsrate = vielfache Expression relativ zu uninfizierten Kontrollen.

n = 16 Tiere pro Zeitpunkt von n = 2 unabhängigen Experimenten. **(B)** Quantifizierung der IL-37 Sekretion in Lunge, BAL und Blut in uninfizierten Tieren sowie 24 h und 48 h nach Infektion durch ELISA. Detektionslimit = 15 pg/ml. n = 8 Tiere pro Zeitpunkt von n = 2 unabhängigen

Experimenten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung (A, B). nd = nicht detektiert; ns = nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; *** $p < 0,0005$.

Es wird deutlich, dass IL-37 als Antwort auf eine Pneumokokken-Infektion exprimiert wird, was sich in signifikanten Mengen von IL-37 mRNA in Lunge und Blut nach allen Infektionszeiten zeigt (Abbildung 13A). Dabei konnten für die Lunge 8 h, 24 h und 48 h ausgewertet werden, für das Blut nur 8 h und 24 h, da der Kreislauf der Tiere nach 48 h so geschwächt war, dass die Entnahme einer für die RNA-Isolation ausreichenden Blutmenge nicht mehr möglich war. Uninfizierte Kontrollgruppen zeigten wie die RAW-Zellen, nur eine geringe Basalexpression von IL-37 in der Lunge bzw. keine Expression in BAL und Blut (Abbildung 13B). In Übereinstimmung mit der transkriptionellen Hochregulierung konnte beobachtet werden, dass das IL-37 Protein in Lunge und BAL 24 h und 48 h nach einer Infektion mit *S. pneumoniae* sekretiert wird. Im Blut unterlagen die nach 48 h nachgewiesenen IL-37-Mengen starken Schwankungen, so dass eine Auswertung mit dem „einseitigen One-way ANOVA Test“ gefolgt vom „*Dunnett's Multiple Comparison Test*“ (Dunn test) keine Signifikanz ergab (Abbildung 13B).

6.3 Untersuchung der Bedeutung von IL-37 im Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie

In einem ersten Schritt konnte gezeigt werden, dass IL-37 in Folge einer Infektion mit Pneumokokken in Lunge, BAL und Blut exprimiert und sekretiert wird (Abbildung 13). Im Folgenden sollte daher untersucht werden, ob und welchen Einfluss IL-37 auf den Krankheitsverlauf der Pneumokokken-Pneumonie ausübt.

Für alle im Kapitel 6.3 dargestellten Experimente wurden WT-Mäuse und IL-37tg Mäuse mit D39 intranasal infiziert. Die Infektionsdosis betrug 5×10^7 CFU/Maus. Mitgeführte, uninfizierte Kontrollen erhielten eine intranasale Applikation von PBS in einem äquivalenten Volumen.

6.3.1 IL-37tg-Mäuse zeigen eine erhöhte Sterblichkeit im Vergleich zu den WT-Mäusen

Zunächst wurde eine Überlebenszeitanalyse durchgeführt. Dabei wurden infizierte WT-Mäuse und IL-37-tg-Mäuse über einen Zeitraum von 96 h nach Infektion überwacht. Der Krankheitsverlauf wurde alle 12 h kontrolliert und protokolliert. Als klinische Parameter wurden Körpertemperatur und Gewicht erfasst. Zusätzlich wurde auf den Grad der

Aktivität, das Trink- und Fressverhalten, das Aussehen von Fell und Augen, die Atmung sowie das Sozialverhalten geachtet und nach einem Punktesystem bewertet (siehe Anhang, 10.1). Die Anzahl der überlebenden Tiere wurde zu jedem Beobachtungszeitpunkt notiert und mittels einer Kaplan-Meier-Kurve visualisiert.

Die Überlebenszeitanalyse ergab, dass die IL-37tg-Mäuse in Folge einer Infektion mit *S. pneumoniae* eine signifikant höhere Sterblichkeit zeigen als die infizierten WT-Mäuse. 72 h nach der Infektion zeigten die IL-37tg-Mäuse eine Sterblichkeit von 100% während zu diesem Zeitpunkt noch 20% der WT-Mäuse am Leben waren und innerhalb der folgenden 24 h auch nicht mehr verstarben. Der Gesundheitszustand der Kontrolltiere beider Gruppen hingegen blieb im Laufe der 96 h unverändert (Abbildung 14).

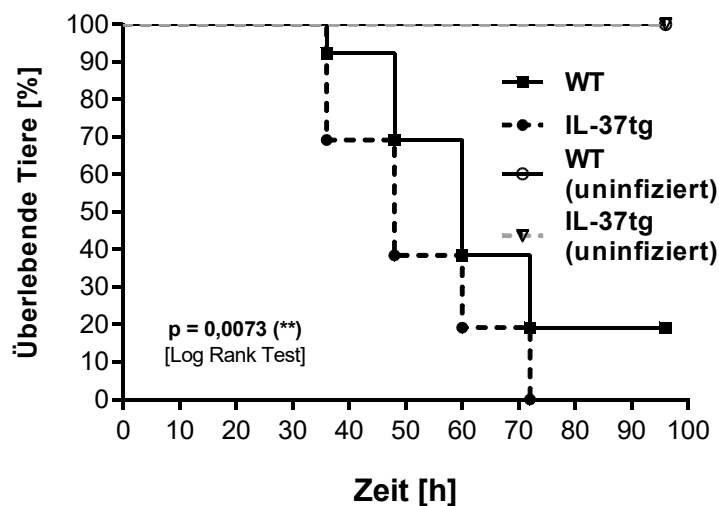


Abbildung 14: Überlebenszeitanalyse von IL-37tg- und WT-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae* IL-37tg-Mäuse und WT-Mäuse wurden mit D39 mit einer Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert. Mitgeführte, uninfizierte Kontrollen erhielten eine intranasale Applikation von PBS in einem äquivalenten Volumen. Es erfolgte die Erfassung der Sterblichkeit über 96 h. Bei den infizierten Tieren umfasste jede Gruppe jeweils $n = 26$ Tiere von $n = 4$ unabhängigen Experimenten. Bei den uninfizierten Kontrollen umfasste jede Gruppe jeweils $n = 8$ Tiere von $n = 2$ unabhängigen Experimenten.

6.3.2 IL-37tg-Mäuse weisen eine erhöhte Bakterienlast in Lunge, BAL und Blut auf

Die Eliminierung der Pneumokokken aus der Lunge und die damit verbundene Vorbeugung der bakteriellen, systemischen Ausbreitung ist das Hauptziel der körpereigenen Abwehr bei der Bekämpfung einer Pneumokokken-Pneumonie (Vernatter und Pirofski 2013).

Deshalb wurde in einem weiteren experimentellen Ansatz der Einfluss von IL-37 auf die Erregerzahl in Lunge, BAL und Blut untersucht. Hierzu wurden Lunge, BAL und Blut 24 h und 48 h nach erfolgter Infektion mit *S. pneumoniae* entnommen und es erfolgte eine Anzucht auf Columbia-Blutagar-Platten. Im Vergleich zu den WT-Mäusen wiesen die IL-37tg-Mäuse

24 h nach Infektion signifikant erhöhte Erregerzahlen in Lunge, BAL und Blut auf. Auch 48 h *post infectionem* war die Erregerlast bei den IL-37tg-Mäusen in Lunge und BAL signifikant höher als bei den WT-Mäusen, während die bakterielle Belastung im Blut zu diesem Zeitpunkt der Infektion in beiden Gruppen ähnlich hoch war (Abbildung 15).

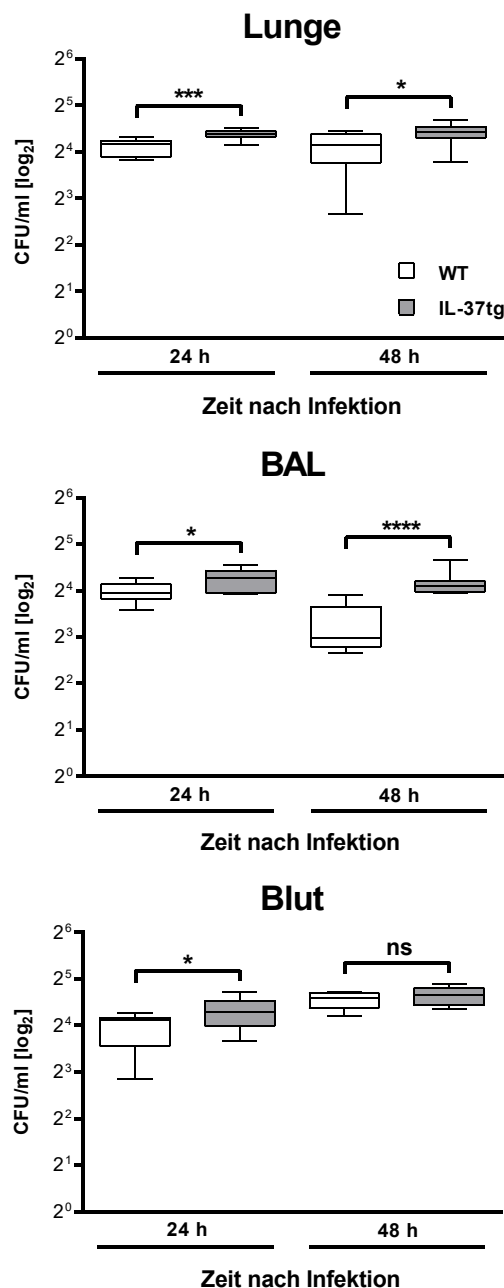


Abbildung 15: Bestimmung der Bakterienlast in Lunge, BAL und Blut von IL-37tg- und WT-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae* IL-37tg-Mäuse und WT-Mäuse wurden mit D39 mit einer Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert. Nach 24 h und 48 h wurden die Tiere präpariert und unterschiedliche Verdünnungen von Lungen-Homogenaten, BAL und Blut auf Columbia-Blutagar-Platten ausgestrichen. Detektionslimit = 10 CFU/ml. Die Daten sind als Box-Whisker-Plot dargestellt und zeigen den geringsten Wert, das untere Quartil, den Median, das obere Quartil und den höchsten Wert an. Jeder Zeitpunkt umfasst pro Gruppe jeweils n = 10 Tiere von n = 2 unabhängigen Experimenten. ns = nicht signifikant; *p < 0,05; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001.

6.3.3 Die transgene Expression von IL-37 beeinflusst das Expressionsmuster pro-inflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie

Die Pneumokokken-Pneumonie ist durch eine massive Entzündungsreaktion charakterisiert, die hauptsächlich durch die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen koordiniert wird. Diese Entzündungsmediatoren sind dabei wichtige Schlüssel-Proteine, welche die zweite Verteidigungslinie der Immunabwehr darstellen und regulieren (Vernatter und Pirofski 2013, Tuomanen et al. 1995, Nelson und Summer 1998). Deshalb sollte in einem nächsten Schritt der Einfluss von IL-37 auf das Expressions- und Sekretionsmuster ausgewählter Zytokine und Chemokine untersucht werden. Hierzu wurde zunächst infizierten IL-37tg- und WT-Mäusen die Lunge nach 8 h, 24 h und 48 h entnommen und die Menge an mRNA der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β analysiert.

Die Ergebnisse lassen erkennen, dass sich ein biphasisches, zeitabhängiges Muster bezüglich der Expression von IL-6, TNF- α und IL-1 β abzeichnet. Während 8 h nach der Infektion die mRNA-Mengen aller drei Zytokine in den Lungen der IL-37tg-Mäuse signifikant geringer sind, als in den Lungen der WT-Mäuse, kommt es im weiteren Verlauf der Infektion zu einer Umkehr des Expressionsmusters. 24 h und 48 h *post infectionem* sind signifikant höhere Mengen an IL-6, TNF- α und IL-1 β mRNA in den Lungen der IL-37tg-Mäuse, verglichen mit den WT-Mäusen, zu verzeichnen (Abbildung 16).

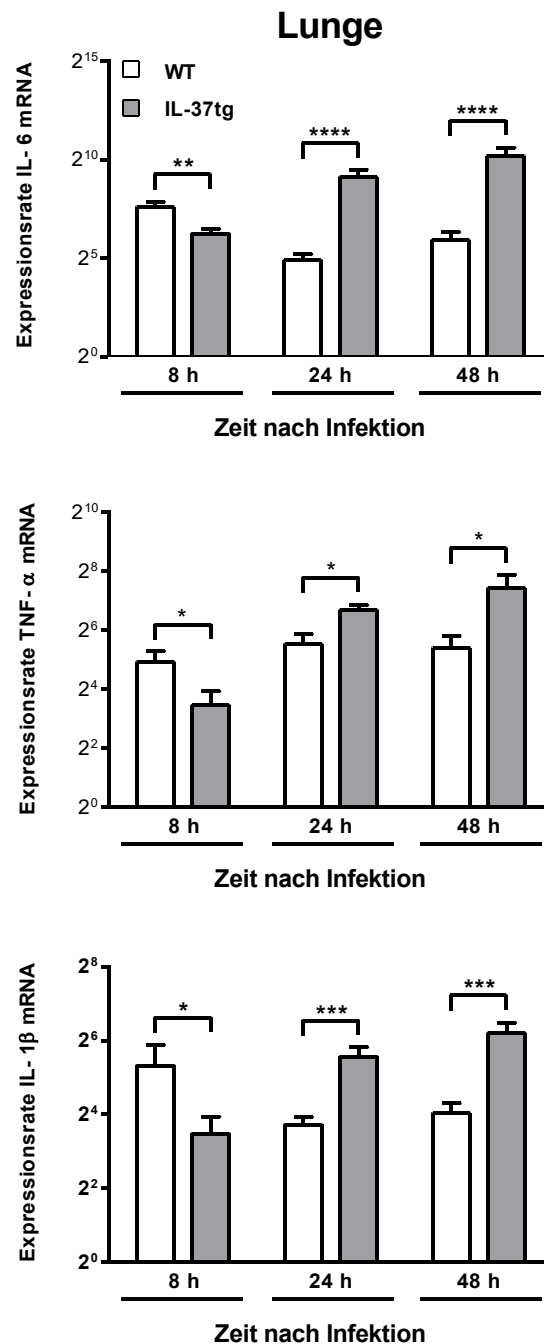
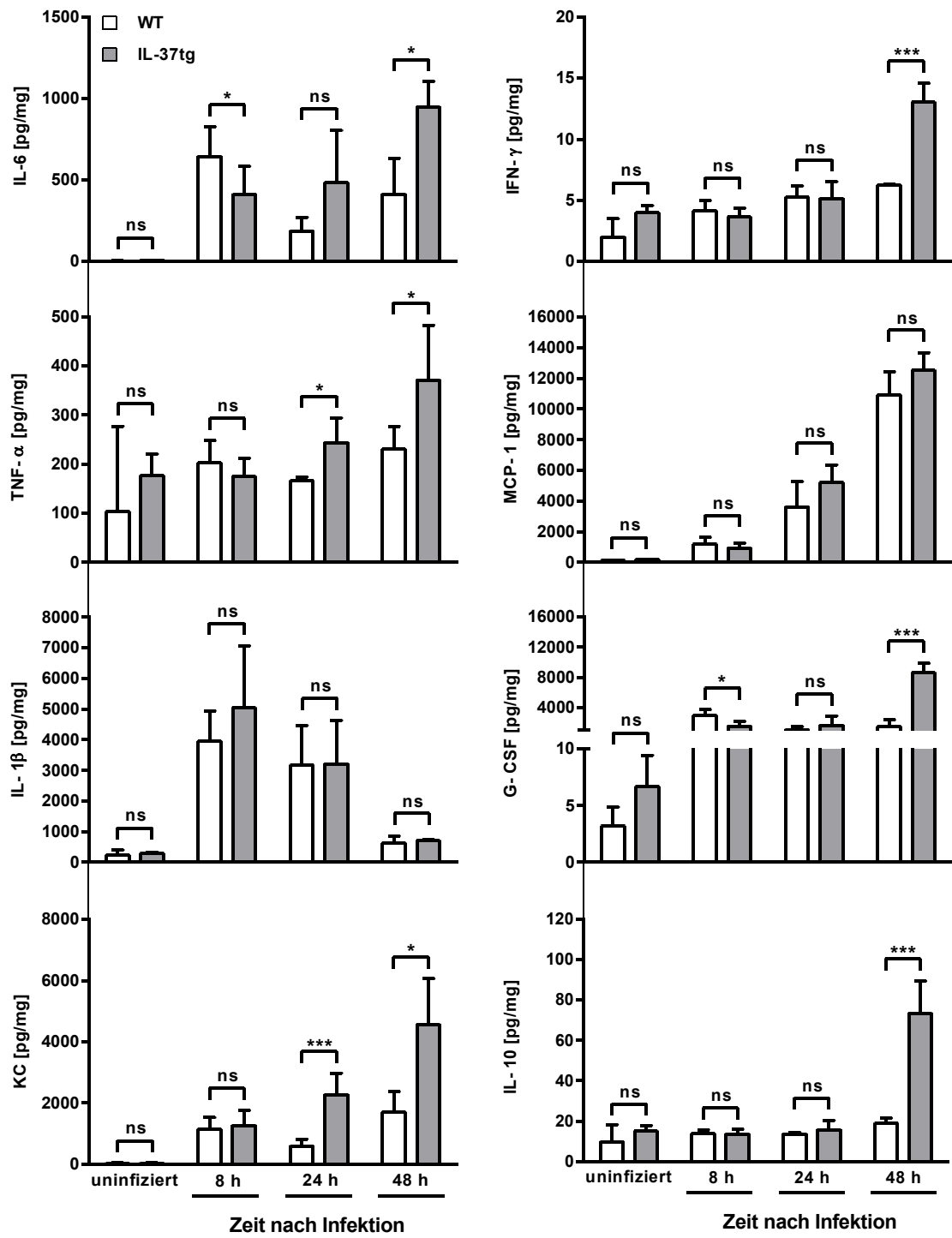


Abbildung 16: mRNA Expressionsprofil von IL-6, TNF- α und IL-1 β in den Lungen von IL-37tg- und WT-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae* IL-37tg-Mäuse und WT-Mäuse wurden mit D39 mit einer Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert. Uninfizierte Tiere, die als Kontrollgruppen mitgeführt wurden, erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS. Nach 8 h, 24 h und 48 h wurden die Lungen entnommen und die RNA isoliert. Die Abbildung zeigt die mRNA-Mengen von IL-6, TNF- α und IL-1 β zu den genannten Zeitpunkten. Die Analyse erfolgte mittels qPCR. Expressionsrate = vielfache Expression relativ zu uninfizierten Kontrollen. n = 6 Tiere pro Gruppe für 8 h; n = 8 Tiere pro Gruppe für 24 h und 48 h; n = 8 Tiere pro Gruppe für die uninfizierten Kontrollen von n = 2 unabhängigen Experimenten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung. *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005; ****p < 0,0001.

In einem nächsten Schritt wurde die Sekretionsrate ausgewählter Zytokine und Chemokine in Lunge und Blut bei den infizierten IL-37tg- und WT-Mäusen bestimmt (Abbildung 17). Die Ergebnisse zeigen, dass sich ein ähnliches Muster abzeichnet wie bei den gezeigten mRNA-Daten in Abbildung 16. Für den 8 h-Zeitpunkt konnten wir in den Lungen der IL-37tg-Mäuse signifikant geringere Mengen von IL-6 und G-CSF detektieren als in den Lungen der WT-Mäuse, während die anderen gemessenen Zytokine und Chemokine ähnlich hohe Werte in beiden Gruppen aufwiesen (Abbildung 17A). Das deutet darauf hin, dass zu diesem Zeitpunkt bei den IL-37tg-Mäusen bereits der Wechsel zur hyperinflammatorischen Immunantwort begonnen hat, weshalb die Protein-Mengen ähnlich sind. Denn im weiteren Verlauf der Infektion, vorrangig 48 h *post infectionem*, zeigten sich bei den meisten gemessenen Entzündungsmediatoren signifikant höhere Mengen in den Lungen der IL-37tg-Mäuse als in den Lungen der WT-Mäuse. Im speziellen traf dies für IL-6, TNF- α , KC, IFN- γ , G-CSF und IL-10 zu (Abbildung 17A). Die gemessenen Werte im Blut zeigten ein ähnliches Bild. Nach 24 h waren die Protein-Mengen in beiden Gruppen auf einem ähnlich hohen Level, während 48 h nach der Infektion signifikant höhere Mengen für IL-6, TNF- α , IL-1 β , KC, IFN- γ , MCP-1 (CCL2) und IL-10 bei den IL-37tg-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen detektierbar waren (Abbildung 17B).

A

Lunge



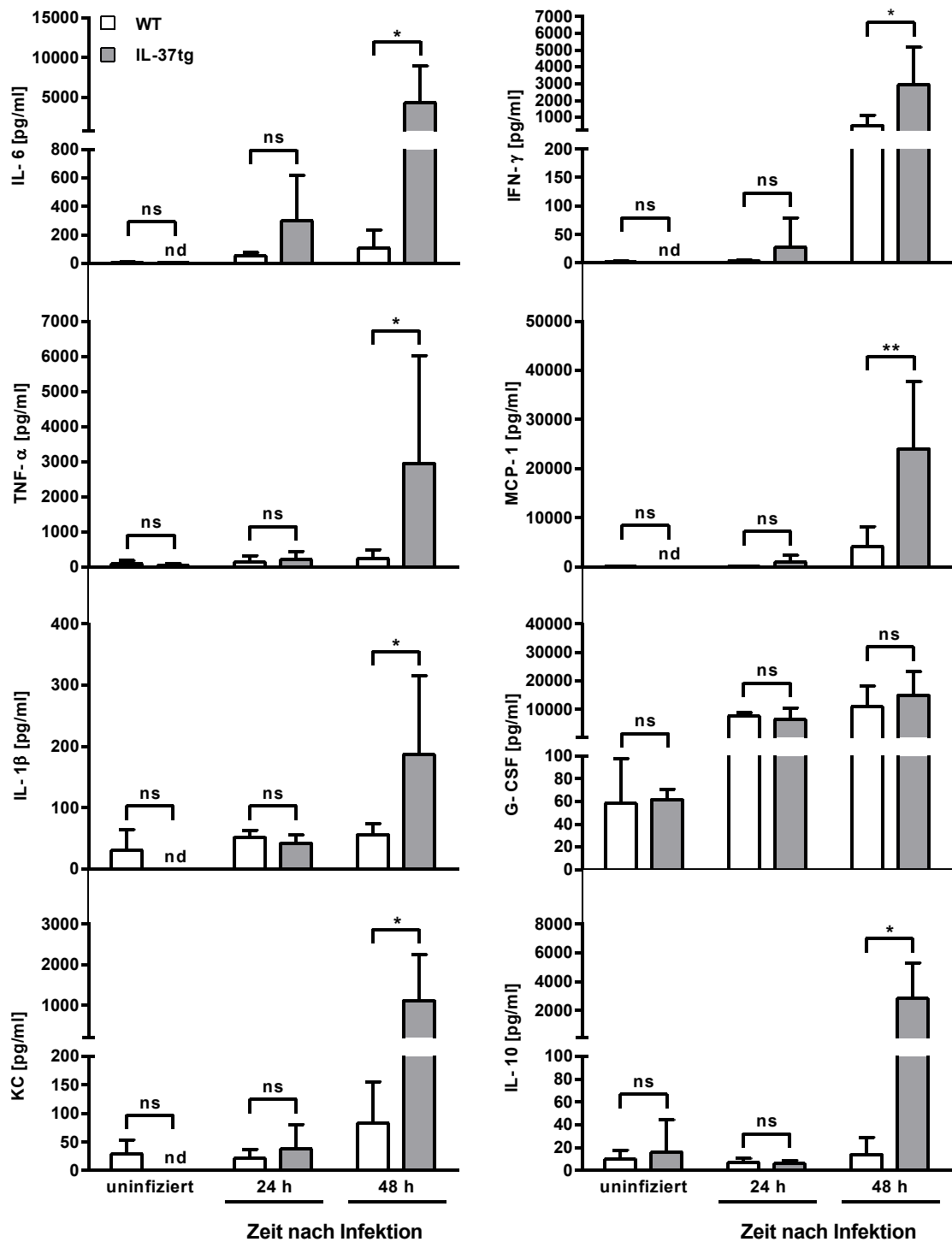
B**Blut**

Abbildung 17: Sekretionsrate ausgewählter Zytokine und Chemokine in Lunge und Blut von IL-37tg- und WT-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae*

IL-37tg-Mäuse und WT-Mäuse wurden mit D39 mit einer Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert. Uninfizierte Tiere, die als Kontrollgruppen mitgeführt wurden, erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS. Nach 24 h und 48 h wurden die Tiere präpariert und die Lungen sowie das Blut entnommen. Es erfolgte die Quantifizierung der Protein-Mengen von IL-6, TNF- α , IL-1 β , KC, IFN- γ , MCP-1, G-CSF, und IL-10 mittels Multiplex-ELISA in der Lunge (A) und im

Blut (**B**). n = 4 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt von n = 2 unabhängigen Experimenten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung. nd = nicht detektiert; ns = nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,005; ***p < 0,0005.

6.3.4 IL-37tg-Mäuse zeigen in der BAL eine verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen

Die Rekrutierung von Entzündungszellen, im Speziellen Leukozyten, welche *S. pneumoniae* erkennen und durch Phagozytose eliminieren, ist ein weiterer wichtiger Schritt, bei der Bekämpfung einer Pneumokokken-Pneumonie durch das Immunsystem (Vernatter und Pirofski 2013). Dabei stellen KC und CCL2 die beiden wichtigsten Zytokine dar, welche die Migration der Leukozyten in die entzündeten Bereiche der murinen Lunge steuern (Asokanathan et al. 2002, Mercer et al. 2014). Aufgrund der beobachteten stärkeren bakteriellen Erregerlast sowie signifikant höherer Mengen an KC und CCL-2 bei den

IL-37tg-Mäusen (Abbildung 15/17), sollte im Weiteren untersucht werden, ob es einen Unterschied bezüglich rekrutierter Alveolarmakrophagen und neutrophiler Granulozyten in der BAL von infizierten IL-37tg- und WT-Mäuse gibt. Dafür wurden den Tieren nach 24 h und 48 h die BAL entnommen, auf Objektträger aufgebracht und anschließend ausgezählt.

Sowohl in der Gruppe der IL-37tg-Mäuse, als auch bei den WT-Mäusen konnte 24 h und 48 h nach Infektion eine gegenüber der jeweiligen PBS-Kontrollgruppe erhöhte Anzahl an Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten beobachtet werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen zeigte sich bezüglich der Verteilung der eingewanderten Zellen 48h nach Infektion durch eine deutlich stärkere Anhäufung (2-fach) von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in der BAL der IL-37tg-Mäuse (Abbildung 18A/B). Repräsentative Bilder der Diff-Quik-Färbungen sind in Abbildung 20 (siehe Anhang, 10.2) dargestellt.

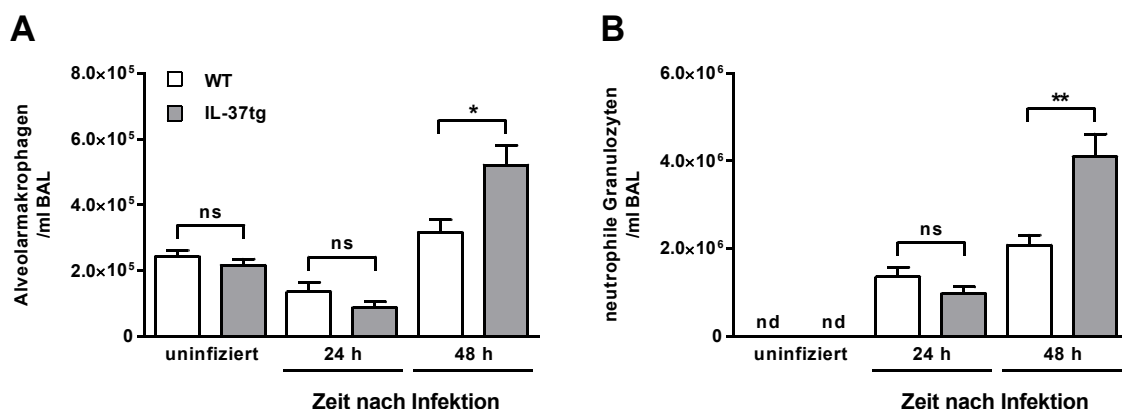


Abbildung 18: Quantifizierung rekrutierter Entzündungszellen in der BAL von IL-37tg- und WT-Mäusen nach Infektion mit *S. pneumoniae* IL-37tg-Mäuse und WT-Mäuse wurden mit D39 mit einer Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert. Uninfizierte Tiere, die als Kontrollgruppen mitgeführt wurden, erhielten ein äquivalentes Volumen an PBS. Nach 24 h und 48 h wurden die Tiere präpariert und die BAL entnommen. Es erfolgte die Quantifizierung der eingewanderten Alveolarmakrophagen (A) sowie der eingewanderten neutrophilen Granulozyten (B) mittels Diff-Quik-Färbung und anschließendem Auszählen der Zellen. n = 8 Tiere pro Gruppe und Zeitpunkt von n = 2 unabhängigen Experimenten. Die Balken repräsentieren den Mittelwert und die Standardabweichung. nd = nicht detektiert; ns = nicht signifikant; *p < 0,05; **p < 0,005.

6.3.5 Die transgene Expression von IL-37 hat massive Gewebeschäden der Lunge mit

übermäßigem Absterben von neutrophilen Granulozyten und vermehrtem Pneumokokkenbefall zur Folge

Ein übermäßiger Influx von neutrophilen Granulozyten kann zu einem erheblichen Gewebeschaden der Lunge bei einer bakteriell hervorgerufenen Pneumonie führen (Moreland et al. 2004, Craig et al. 2009). Um zu klären, welchen Effekt der IL-37-vermittelte, massive, pulmonale Einstrom von neutrophilen Granulozyten auf das Lungengewebe hat, wurden die Lungen von infizierten IL-37tg- und WT-Mäusen histopathologisch untersucht. Dafür wurden die Lungen 48 h nach der Infektion entnommen und 2 µm-Schnitte angefertigt, die entweder mit Hämatoxylin-Eosin (HE), einem anti-Caspase-3 Antikörper oder einem anti-*S. pneumoniae* Antikörper gefärbt und anschließend histopathologisch und immun-histochemisch ausgewertet wurden.

Die Auswertung der Schnitte ergab, dass eine Infektion mit Pneumokokken in beiden Gruppen eine schwere, eitrige Pleuropneumonie hervorruft, bei der neben einer Entzündung des Lungengewebes (auch Lungenparenchym) auch das anliegende Lungenfell (*Pleura visceralis*) betroffen ist. Während die WT-Mäuse im Lungenparenchym und in den perivaskulären Bereichen aber vorrangig eine Infiltration von zahlreichen, intakten neutrophilen Granulozyten aufwiesen (Abbildung 19A/B linke Bilder), zeigten die IL-37tg-Mäuse multifokale, parenchymale Nekrosen, begleitet von einem massiven Zelltod der eingewanderten neutrophilen Granulozyten (Abbildung 19A/B rechte Bilder). Dabei ist die Nekrose gekennzeichnet durch zelluläre Fragmentierung und zellulären Zerfall, Akkumulation von Zelltrümmern sowie Karyolyse.

Desweiteren brachte die Immunfärbung von aktiver Caspase-3, ein Marker für Apoptose, in beiden Gruppen nur vereinzelte, positiv gefärbte Zellen im entzündeten Lungengewebe

hervor und es zeigte sich kein Unterschied zwischen WT- und IL-37tg-Mäusen (Abbildung 19D; Pfeil). Zudem waren die nekrotischen Bereiche innerhalb des Lungengewebes der IL-37tg-Mäuse frei von apoptotischen Zellen, was vermuten lässt, dass die Apoptose als Mechanismus des programmierten Zelltodes während der Pneumokokken-Pneumonie nicht involviert ist (Abbildung 19D rechtes Bild; Sternchen).

Auch zeigten die IL-37tg-Mäuse, im Vergleich zu den WT-Mäusen, eine stärkere Ansammlung von Pneumokokken im Lungenparenchym (Abbildung 20C; Pfeile; rote Bereiche). Dies bestätigt die erhöhte Bakterienlast im Lungengewebe transgener Tiere (Abb. 15).

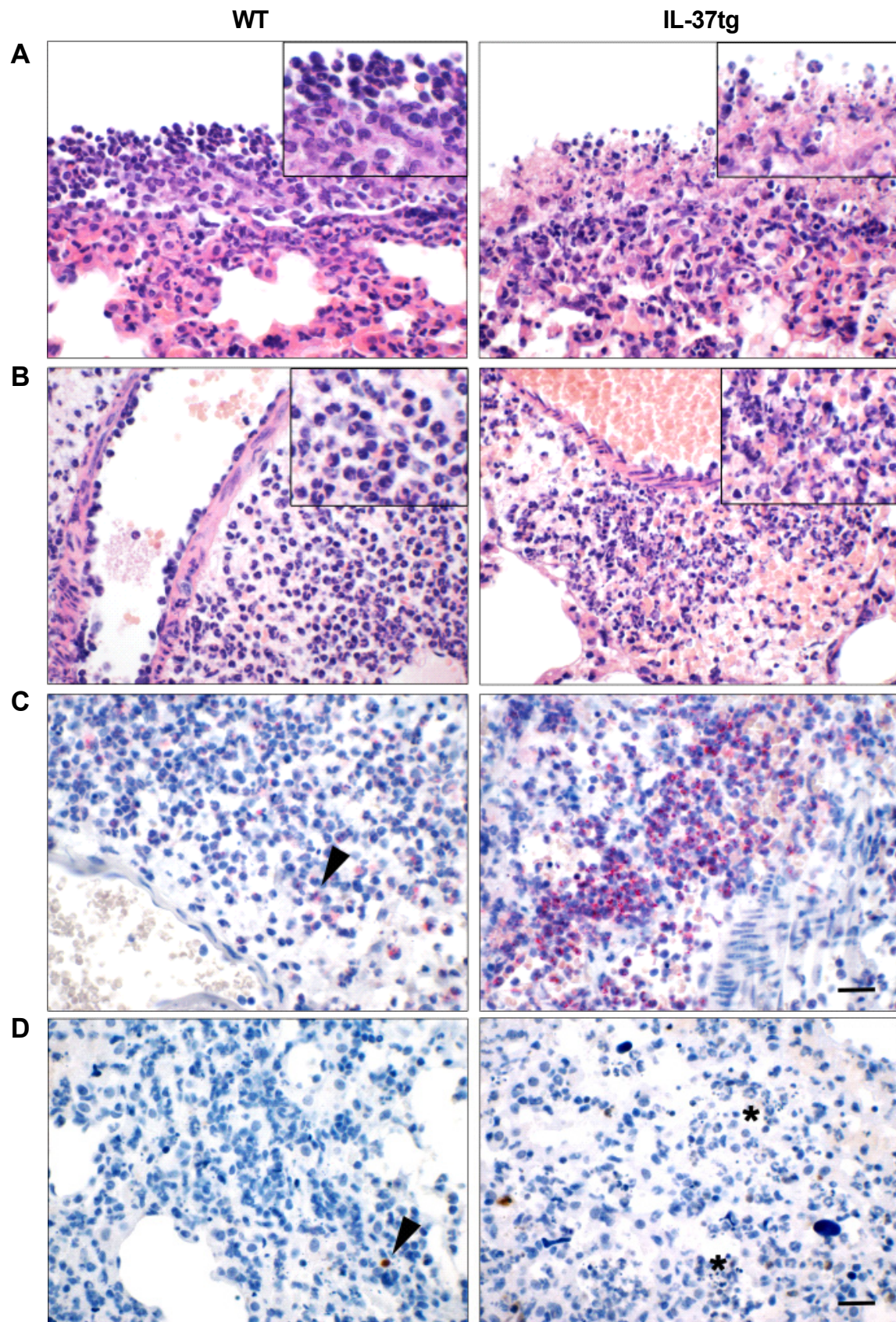


Abbildung 19: Histopathologische und immunhistochemische Auswertung der Lungenschnitte

S. pneumoniae-infizierter IL-37tg- und WT-Mäuse IL-37tg-Mäuse und WT-Mäuse wurden mit D39 mit einer Infektionsdosis von 5×10^7 CFU/Maus intranasal infiziert und die Lungen nach 48h

entnommen und 2 µm-Schnitte angefertigt, die mit **(A/B)** HE, **(C)** einem anti-*S. pneumoniae* Antikörper zur Detektion von *S. pneumoniae* oder **(D)** mit einem anti-Caspase-3 Antikörper zur Detektion von apoptotischen Zellen gefärbt wurden. Gezeigt sind repräsentative Bilder der histopathologischen und immunhistochemischen Auswertung. n = 6 Tiere pro Gruppe von n = 2 unabhängigen Experimenten. Balken (A-D) = 20 µm.

7 Diskussion

In der vorgelegten Arbeit erfolgte die Analyse, welchen Einfluss das anti-inflammatorische Zytokin IL-37 auf das Infektionsgeschehen während einer Pneumokokken-Pneumonie hat. Ziel war die Charakterisierung der durch *S. pneumoniae*-induzierten immunologischen Prozesse *in vitro* und *in vivo* und wie diese durch IL-37 reguliert werden.

Die *in vitro*-Versuche in den RAW-Zellen zeigten, dass die Expression von IL-37 durch *S. pneumoniae* induziert wird. Das synthetisierte IL-37 Protein akkumuliert aber in der Zelle und wird nicht durch Sekretion nach außen abgegeben. Es agiert vermutlich intrazellulär und beeinflusst dort in seiner bekannten Funktion als anti-inflammatorisches Zytokin die Immunantwort, indem es die pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β auf in den RAW-Zellen herunterreguliert. Zudem vermittelt es intrazellulär eine Hemmung des intrazellulären killings von phagozytierten Pneumokokken, während extrazelluläres IL-37 keinen Einfluss hat.

Die *in vivo* am IL-37tg Mausmodell induzierte Pneumokokken-Pneumonie brachte das Resultat, dass IL-37 in den Entzündungsprozess der Infektion involviert ist und die körpereigene Immunabwehr negativ beeinflusst. Die IL-37tg-Mäuse zeigten eine erhöhte bakterielle Belastung in Lunge und BAL, begleitet von einem massiven Einstrom von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Lunge. Zudem zeichneten sich verstärkt nekrotische Bereiche im Lungenparenchym ab, während das Lungengewebe bei den WT-Mäusen intakt war. Hingegen konnte eine Beteiligung von Apoptose nicht nachgewiesen werden. Diese Beobachtungen resultierten in einer erhöhten Mortalität der IL-37tg-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen.

7.1 Der Einfluss von *S. pneumoniae* auf die Expression von IL-37 *in vitro* und *in vivo*

IL-37, ein fundamentaler Suppressor des angeborenen und erworbenen Immunsystems wird in humanen Monozyten, Gewebemakrophagen sowie in anderen Immunzellen exprimiert, wenn diese Zellen im Vorfeld mit dem TLR2-Agonisten MALP-2 bzw. dem TLR4-Agonisten LPS stimuliert wurden (Dinarello et al. 2016). Im Rahmen dieser Arbeit sollte

daher in einem ersten Schritt untersucht werden, ob *S. pneumoniae* die Expression von humanem IL-37 in verschiedenen murinen Modell-Systemen induziert.

In den in dieser Studie erhaltenen Resultaten zeigte sich, dass die IL-37 mRNA und das IL-37 Protein sowohl in unstimulierten RAW-Zellen als auch in uninfizierten IL-37tg-Mäusen nicht oder nur in sehr geringen Mengen detektierbar war während unter der Einwirkung von *S. pneumoniae* die Expressions- und Sekretions-Rate von IL-37 *in vitro* und *in vivo* signifikant anstieg. Ähnliche Beobachtungen machten Nold et al. (Nold et al. 2010), die gezeigt haben, dass in unstimulierten RAW-Zellen, die stabil mit IL-37 transfiziert sind, IL-37 nur in geringen Mengen exprimiert wird und erst nach Stimulation der Zellen mit LPS signifikant ansteigt. Erklären lässt sich das durch das Vorhandensein einer „Instabilitäts“-Sequenz innerhalb der Kodierungsregion von IL-37, wodurch die mRNA in ruhenden, unstimulierten Zellen rasch abgebaut wird (Boraschi et al. 2011, Bufler et al. 2004). Die Stabilisierung der IL-37 mRNA scheint demnach der maßgebliche Mechanismus zu sein, um die Expression von IL-37 auch im Infektionsgeschehen mit *S. pneumoniae in vitro* und *in vivo* zu regulieren. Zudem liegt die Vermutung nahe, dass die Inflammation, die durch *S. pneumoniae* hervorgerufen wird, die Halbwertszeit der IL-37 mRNA verlängert, was die Proteinbiosynthese von IL-37 ermöglicht. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit mittels zellulärer Fraktionierung gezeigt werden, dass das IL-37 Protein, welches als Antwort auf eine Stimulation der RAW-Zellen mit *S. pneumoniae* aus der mRNA synthetisiert wird, in der Zelle akkumuliert und nicht als Zytokin nach außen sekretiert wird. Während im Zytosol und im Zellkern signifikante Mengen an IL-37 im ELISA detektierbar waren, konnte im Zellkulturüberstand kein IL-37 Protein nachgewiesen werden. Dieses Verhalten steht im Einklang mit vorangegangenen Studien, die gezeigt haben, dass sich IL-37 vorrangig im Zellkern und im Zytosol anreichert, wennn stabil transfizierte RAW-Zellen mit LPS stimuliert wurden (Sharma et al. 2008).

Basierend auf der Hypothese, dass IL-37 sowohl intrazellulär, als auch extrazellulär aktiv ist und demnach eine Doppelfunktion als „*dual function*“ Zytokin einnimmt (Dinarello et al. 2016), lässt diese Beobachtung den Schluss zu, dass IL-37 in durch *S. pneumoniae*-stimulierten RAW-Zellen intrazellulär und nicht extrazellulär wirkt.

7.2 *In vitro*-Studien mit *S. pneumoniae* am Modell der stabil transfizierten Mausmakrophagen-Zelllinie RAW 264.7

7.2.1 Der Einfluss von IL-37 auf die durch *S. pneumoniae* induzierte Immunantwort

Um eine systemische Ausbreitung der Pneumokokken-Infektion zu verhindern, ist die Eliminierung der Bakterien in der Lunge von entscheidender Bedeutung. Dieser Vorgang wird durch die Erkennung und anschließende Phagozytose der eingedrungenen Pneumokokken durch Immunzellen sowie die Sekretion von Chemokinen und Zytokinen initiiert (Vernatter und Pirofski 2013). Dabei spielen die Alveolarmakrophagen eine Schlüsselrolle als wichtige frühe Effektoren der angeborenen Immunantwort gegen *S. pneumoniae*. Diese spezialisierten Zellen sind sehr effizient darin, durch Phagozytose aufgenommene Pneumokokken abzutöten und damit zu eliminieren (Dockrell et al. 2003).

Die Ergebnisse in dieser Arbeit zeigen, dass RAW-IL-37-Zellen und RAW-Vektor-Zellen eine ähnlich hohe Phagozytose-Rate aufwiesen, die Fähigkeit, aufgenommene Pneumokokken intrazellulär abzutöten aber durch IL-37 in den RAW-IL-37-Zellen signifikant gehemmt wurde. Interessanterweise ließ sich diese Beobachtung nur bei den RAW-IL-37-Zellen machen, die das IL-37 Protein, wie in dieser Arbeit bestätigt, innerhalb der Zelle akkumulieren und nicht nach Außen abgeben. Denn im Gegensatz dazu war die Effizienz der intrazellulären Eliminierung der Pneumokokken in RAW-Zellen, die mit rekombinanten IL-37 vor-inkubiert wurden ähnlich wie bei den RAW-Zellen, die keine Vorbehandlung mit rekombinanten IL-37 hatten.

IL-37 beeinflusst demnach in den RAW-Zellen nicht den Mechanismus, Pneumokokken zu erkennen und zu phagozytieren. Die Fähigkeit der RAW-Zellen, die aufgenommenen Bakterien effizient abzutöten, wird aber nachweislich durch IL-37 beeinträchtigt. Zudem untermauern die generierten Daten die Hypothese, dass IL-37 in durch *S. pneumoniae*-stimulierten RAW-Zellen intrazellulär wirkt und die beeinträchtigte Fähigkeit der RAW-Zellen, aufgenommenen Pneumokokken abzutöten kein Effekt von extrazellulärem, sondern von intrazellulärem IL-37 ist.

Vorangegangene Studien haben gezeigt, dass IL-37 in RAW-Zellen zu einer Reduktion der Produktion pro-inflammatorischer Zytokine führt und damit verbunden eine Supprimierung der angeborenen und erworbenen Immunität hervorruft, wenn die Zellen mit den TLR-Liganden LPS und MALP-2 stimuliert wurden (Nold et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit wurde deshalb untersucht, ob die durch *S. pneumoniae*-induzierte Expression und Sekretion von IL-37 einen ähnlichen Effekt auf die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine in den RAW-Zellen hervorruft. Dabei wurde sich hauptsächlich auf die drei Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β konzentriert. Dabei kommt IL-6 durch die Art seiner komplexen Funktionen eine Schlüsselstellung innerhalb der Zytokine zu, in dem es den Übergang von Mechanismen der angeborenen Immunität hin zu Mechanismen der erworbenen Immunität

innerhalb des Entzündungsprozesses reguliert (Jones 2005). Des Weiteren ist TNF- α , welches hauptsächlich von Makrophagen ausgeschüttet wird, ein wichtiges Zytokin bei lokalen und systemischen Entzündungen. Dabei besteht seine wichtigste Funktion darin, die Aktivität verschiedener Immunzellen zu regeln (Rahman und McFadden 2006). Auch IL-1 β als Mitglied der IL-1-Familie ist eines der Zytokine, die zu den Entzündungsmediatoren gezählt werden. Es wird hauptsächlich von Blut-Monozyten produziert und ist ein zentraler Botenstoff in der Antwort des Wirtsorganismus auf Fremdeinflüsse wie LPS (Dinarello 2005).

Die hier beschriebenen Untersuchungen zeigten, dass in RAW-IL-37-Zellen die mRNA- und Protein-Menge der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α und IL-1 β signifikant geringer war als bei den RAW-Vektor Zellen nach Stimulation mit *S. pneumoniae*. IL-37 reguliert, als Antwort auf eine Stimulation der Zellen mit Pneumokokken, pro-inflammatorische Entzündungsmechanismen herunter und stellt somit einen potentiellen Suppressor der angeborenen und erworbenen Immunität dar. Diese Daten werden von vorangegangenen Studien bestätigt, welche ähnliche immunmodulatorische Effekte von IL-37 gefunden haben (Dinarello et al. 2016).

7.3 Die Bedeutung von IL-37 in der Pneumokokken-Pneumonie durch *in vivo*-Studien an einem IL-37tg Mausmodell

7.3.1 IL-37tg-Mäuse zeigen eine erhöhte Sterblichkeit sowie eine stärkere bakterielle Belastung von Lunge, BAL und Blut im Vergleich zu den WT-Mäusen

Einem breiten Spektrum an Studien, welche Bedeutung IL-37 bei entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen zukommt, steht nur ein kleiner Anteil an Publikationen gegenüber, was für eine Rolle IL-37 bei mikrobiellen Infektionen, insbesondere bei Infektionen mit Bakterien, einnimmt. (Moretti et al. 2014, van de Veerdonk et al. 2014, Huang et al. 2015, Zhao et al. 2017). Deshalb sollte in dieser Arbeit die Bedeutung von IL-37 mit seinen immunsupprimierenden Eigenschaften in der Pneumokokken-Pneumonie *in vivo* am murinen Modell IL-37tg-Mäuse untersucht werden. Dabei ergab eine erste Untersuchung, dass IL-37tg-Mäuse im Vergleich zu WT-Mäusen nach Induktion einer *S. pneumoniae*-assoziierten Pneumonie eine signifikant höhere Mortalitätsrate aufwiesen. Obwohl beide Gruppen deutliche Krankheitszeichen zeigten, waren nach 72 h alle IL-37tg-Mäuse verstorben, während noch 20% der WT-Mäuse nach dieser Zeit am Leben waren. Diese infizierten WT-Mäuse zeigten weder zu diesem Zeitpunkt noch innerhalb der folgenden 24 h Krankheitszeichen. Die Infektion mit Pneumokokken führt demnach

nachweislich zu einer systemischen Infektion sowohl bei den WT- als auch bei den IL-37tg-Mäusen, wobei IL-37 die körpereigene Abwehr negativ zu beeinflussen scheint, was zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufes bis hin zum Tod führt. Im Folgenden sollte deshalb näher untersucht werden, wie IL-37 die Immunabwehr im Verlauf einer Pneumokokken-Pneumonie beeinflusst.

Die Eliminierung der Pneumokokken aus der Lunge und die damit verbundene Vorbeugung der bakteriellen, systemischen Ausbreitung ist das Hauptziel der körpereigenen Abwehr bei der Bekämpfung einer Pneumokokken-Pneumonie (Vernatter und Pirofski 2013). Gelingt diese nicht, kommt es zu einer invasiven Pneumokokken-Infektion, bei der die Transmigration der Luft-Blut-Schranke in der Lunge zur Dissemination der Bakterien ins Blut führt, was eine Bakteriämie mit Ausbreitung der Erreger auf den gesamten Organismus zur Folge hat (Laterre et al. 2005). Deshalb wurde zunächst untersucht, wie hoch die bakterielle Belastung in Lunge, BAL und Blut von IL-37tg- und WT-Mäusen ist. Vor allem in Lunge und BAL zeigten sich über einen Zeitraum von 48 h bei den IL-37tg-Mäusen signifikant höhere Erregerzahlen, verglichen mit den WT-Mäusen. Auch im Blut konnte innerhalb der ersten 24 h eine deutlich höhere Bakterienlast bei den IL-37tg-Mäusen beobachtet werden. In Anlehnung an die Beobachtung, dass die intrazelluläre Eliminierung phagozytierter Pneumokokken in RAW-Makrophagen unter Einfluss von IL-37 reduziert ist lässt vermuten, dass die pulmonale Abwehr der Alveolarmakrophagen, eingedrungene Bakterien zu eliminieren, gestört ist.

Auch wenn es in beiden Gruppen im Verlauf der Infektion zu einer Bakteriämie kam, scheinen die WT-Mäuse die Infektion einzudämmen, was zu einer Überlebensrate von 20% führt, während die körpereigene Abwehr der IL-37tg-Mäuse wahrscheinlich gestört ist, was vermutlich eine Ausbreitung auf andere Organe mit Tod durch Eintreten einer Sepsis auslöst. Weiterführende Untersuchungen sollten deshalb klären, wie die Immunreaktion im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie durch IL-37 beeinflusst wird.

7.3.2 Der Einfluss von IL-37 auf das Expressionsmuster pro-inflammatorischer Zytokine und Entzündungsmediatoren im Verlauf der Pneumokokken-Pneumonie

Die Analyse des Status einer Reihe von ausgewählten Zytokinen und Chemokinen in Lunge und Blut ergab, dass die Expression und Sekretion dieser Entzündungsmediatoren bei der Infektion mit Pneumokokken biphasisch verläuft. Zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Infektion (8 h) reprimiert IL-37 die pro-inflammatorische Immunantwort, während es im

weiteren Verlauf, innerhalb von 48 h, zu einer überschießenden pro-inflammatorischen Reaktion des Immunsystems kommt, was sich in signifikant höheren Mengen an IL-6, TNF- α , KC, IFN- γ , G-CSF in der Lunge sowie IL-6, TNF- α , IL-1 β , KC, IFN- γ , MCP-1 (CCL2) im Blut der IL-37tg-Mäuse im Vergleich zu den WT-Mäusen zeigte. Dabei scheint jedes Zytokin, was als Folge der IL-37-induzierten Modulierung der Immunantwort hochreguliert wird, in die Krankheitspathologie spezifisch involviert zu sein. Insbesondere IL-1 β , dessen Supprimierung einen schützenden Effekt gegen respiratorische Infektionen mit *S. pneumoniae* zeigte (Fatykhova et al. 2015, Witzenrath et al. 2011), scheint bei erhöhten Leveln, wie es in dieser Arbeit in der späten Phase der Infektion bei den IL-37tg-Mäusen zu beobachten war, die Fähigkeit der Pneumokokken, sterile Kompartimente zu infiltrieren, zu erleichtern. Eine ungestörte Vermehrung des Erregers sowie massive Gewebeschäden sind die Folge (Moretti et al. 2014). Interessanterweise konnten auch signifikant höhere Mengen des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 in den Lungen und der BAL der IL-37tg-Mäuse beobachtet werden. Es ist bekannt, dass IL-10 die körpereigene Immunabwehr der Maus während einer Pneumokokken-Pneumonie beeinträchtigt, was zu einer ungehinderten systemischen Ausbreitung der Bakterien und einer gesteigerten Mortalität führt (van der Poll et al. 1996). Es ist daher möglich, dass der erhöhte IL-10-Spiegel, der bei den IL-37tg-Mäusen beobachtet werden konnte, den immunsupprimierenden Effekt von IL-37 noch zusätzlich verstärkt.

7.3.3 IL-37tg-Mäuse zeigen in der BAL eine verstärkte Rekrutierung von Entzündungszellen

Die Rekrutierung von Entzündungszellen, im Speziellen Leukozyten, welche *S. pneumoniae* erkennen und durch Phagozytose eliminieren, ist ein weiterer wichtiger Schritt, bei der Bekämpfung einer Pneumokokken-Pneumonie durch das Immunsystem (Vernatter und Pirofski 2013). Dabei stellen KC und CCL2 die beiden wichtigsten Zytokine dar, welche die Migration der Leukozyten in die entzündeten Bereiche der murinen Lunge steuern (Asokanathan et al. 2002, Mercer et al. 2014). Im Lungengewebe ansässige Alveolarmakrophagen repräsentieren dabei die erste Abwehrlinie im Kampf gegen *S. pneumoniae*. Ihr Hauptziel liegt darin, die Lunge von den Pneumokokken zu befreien. (Calbo und Garau 2010, Mosser und Edwards 2008). Sind die Alveolarmakrophagen überlastet und können die Anzahl an Bakterien in der Lunge nicht mehr kontrollieren, werden neutrophile Granulozyten rekrutiert, welche die Eliminierung der Bakterien unterstützen (Dockrell et al. 2003, Knapp et al. 2003, Herbold et al. 2010). Im Rahmen dieser Arbeit konnten signifikant erhöhte Mengen an KC und MCP-1 bei den IL-37tg-

Mäusen detektiert werden. Innerhalb von 48 h zeigte sich folglich ein starker Influx von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten in die Lungen der IL-37tg-Mäuse, während die WT-Mäuse 50% weniger rekrutierte Zellen aufwiesen.

Die Pneumokokken-Pneumonie ist durch eine starke Entzündungsreaktion des Wirtsorganismus gekennzeichnet, die hauptsächlich durch Zytokine und Chemokine reguliert wird. Dabei stellt die Infektion einen dynamischen Prozess dar, wo die Zeit ausschlaggebend für das Maß der bakteriellen Ausbreitung ist (Tuomanen et al. 1995, Nelson und Summer 1998, Calbo und Garau 2010). Die Ergebnisse lassen deshalb darauf schließen, dass die Ereignisse, die in den ersten Stunden der Infektion mit Pneumokokken stattfinden, entscheidend dafür sind, ob die Infektion eingedämmt wird und somit kontrollierbar bleibt oder in einer für den Wirt lebensgefährlichen Infektion endet. Es zeichnet sich ein biphasischer Verlauf ab, bei dem einer frühen Phase der Immunsuppression durch IL-37 eine zweite, spätere Phase folgt, in der die Mengen der pro-inflammatorischen Entzündungsmediatoren auf ein massives Level ansteigen. Zudem wird die Infektion von einem starken Einstrom an Leukozyten in die Lunge begleitet. Diese Faktoren scheinen es den Bakterien zu ermöglichen sich ungehindert in der Lunge infizierter IL-37tg-Mäuse auszubreiten. Des Weiteren unterstützt der Fakt, dass das Immunsystem trotz eines starken Einstroms von neutrophilen Granulozyten in die Lunge nicht in der Lage ist, die bakterielle Ausbreitung bei den IL-37tg-Mäusen zu kontrollieren, die Hypothese, dass die Pneumokokken eliminiert werden müssen, bevor ihr Wachstum einen Schwellenwert überschreitet, wo auch eine intensive Entzündungsreaktion die Infektion nicht mehr eindämmen kann.

7.3.4 Histopathologische und immunhistochemische Beurteilung von infizierten Lungenschnitten bei IL-37tg- und WT-Mäusen

Neben dem positiven Resultat, die neutrophile Granulozyten bei der Bekämpfung der Pneumokokken in der Lunge durch Eliminierung der Erreger haben, kann ein übermäßiger Influx dieser Zellen aber auch zu einem erheblichen Gewebeschaden der Lunge bei einer bakteriell hervorgerufenen Pneumonie führen (Moreland et al. 2004, Craig et al. 2009). Dabei spielen vor allem die Freisetzung von „Reaktiven Sauerstoffspezies“ (engl.: *ROS* = *reactive oxygen species*) und Proteinasen bei der Schädigung des Lungenparenchyms eine entscheidende Rolle (Dallaire et al. 2001). Histopathologische Untersuchungen ergaben, dass eine Infektion mit Pneumokokken sowohl bei den IL-37tg- als auch bei den WT-Mäusen eine schwere, eitrige Pleuropneumonie hervorruft, bei der neben einer Entzündung des Lungenparenchyms auch das anliegende Lungenfell (lat.: *Pleura visceralis*) betroffen

ist.

Die

IL-37tg-Mäuse wiesen aber, im Gegensatz zu den WT-Mäusen, eine signifikant stärkere Entzündung des Lungengewebes mit multifokalen, parenchymalen Nekrosen auf, begleitet von einem massiven Zelltod der eingewanderten neutrophilen Granulozyten. Die übermäßige Anzahl von neutrophilen Granulozyten in den Lungen der IL-37tg-Mäuse scheint demnach zu einer unkontrollierten Ausbreitung der Entzündung im Lungenparenchym zu führen, was zu dem klinischen Bild der nekrotisierenden Pneumonie führt.

Neben der Nekrose, stellt auch die Apoptose eine Form des Zelltodes dar. Bei der Nekrose schwillt die Zelle an, wobei deren Plasmamembran zerstört wird. Als Folge kommt es zu lokalen Entzündungen des umliegenden Gewebes, da Cytoplasma und Zellorganellen in den Extrazellularraum freigesetzt werden, welche durch Makrophagen beseitigt werden müssen. Bei der Apoptose hingegen setzt ein Schrumpfen der Zelle ein und es findet ein Abbau der DNA durch Endonukleasen in definierte Stücke statt (Formigli et al. 2000). Um zu untersuchen, ob neben der beobachteten Nekrose auch die Apoptose in das Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie involviert ist und ob IL-37 Einfluss darauf nimmt, wurden im Rahmen dieser Arbeit die Lungenschnitte immunhistochemisch mit aktiver Caspase-3, ein Marker für Apoptose, gefärbt. In beiden Gruppen waren nur vereinzelte, positiv gefärbte Zellen im entzündeten Lungengewebe detektierbar und es zeigte sich kein Unterschied zwischen WT- und IL-37tg-Mäusen. Aus Sicht des Immunsystems ist es sinnvoll, dass Zellen, die mit intrazellulären Erregern infiziert sind, durch Apoptose sterben und eliminiert werden, da diese phagozytierten Bakterien vom Überleben der Wirtszellen abhängen und so eine weitere Ausbreitung, welche in einer Sepsis resultieren kann, eingeschränkt wird (Hotchkiss et al. 2002). Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse lassen aber vermuten, dass die Apoptose nicht in das Infektionsgeschehen der Pneumokokken-Pneumonie, wie sie hier induziert wurde, beteiligt ist, da auch die WT-Mäuse kaum apoptotische Zellen in der Lunge aufwiesen. Die Nekrose hingegen ist bei den transgenen Tieren Bestandteil des Infektionsgeschehens, scheint aber durch IL-37 induziert zu werden, da die Lungen der WT-Mäuse frei von nekrotischen Bereichen waren.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass das immunsupprimierende Potential von IL-37 bei einer durch *S. pneumoniae*-induzierten Pneumonie in der Maus für eine effektive Immunantwort hinderlich ist. Die Fähigkeit der Mäuse, die Infektion zu kontrollieren, wird nachweislich beeinträchtigt. Die hier gewonnenen Daten könnten darauf hindeuten, dass sich aufgrund der Suppression pro-inflammatorischer Entzündungsmediatoren in der Anfangsphase der Infektion, die Erreger unkontrolliert in der Lunge ausbreiten können.

Folglich kommt es zu einer stärkeren Entzündung des Gewebes. Als Antwort darauf kommt es im weiteren Verlauf zu einer massiven Freisetzung von Zytokinen und Chemokinen, wodurch verstärkt neutrophile Granulozyten rekrutiert werden, die dann durch Nekrose einen massiven Gewebeschaden hervorrufen. Letztendlich wird den Pneumokokken dadurch der Übertritt ins Blut erleichtert. Das Risiko einer lebensbedrohlichen, unkontrollierbaren Bakteriämie mit Sepsis und Tod wird dadurch deutlich erhöht.

8 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Arbeit lassen den Schluss zu, dass das Verhältnis der pro-und-anti-inflammatorischen Entzündungsreaktionen während der Pneumokokken-Pneumonie entscheidend für den Verlauf der Erkrankung ist. Hier konnte gezeigt werden, dass die während der frühen Phase der Infektion durch IL-37 induzierte Suppression der pro-inflammatorischen Zytokine für den Krankheitsverlauf nachteilig ist. Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-37 bewirken dabei, dass die Kontrolle der Ausbreitung der Pneumokokken-Infektion erheblich verschlechtert wird. Dadurch wird ein inflammatorischer Prozess in Gang gesetzt, der durch das Immunsystem nicht mehr kontrolliert werden kann und zu einer höheren Sterblichkeit führt. Ein erster klinischer Ansatz könnte demnach sein, IL-37 im Verlauf einer Pneumokokken-Infektion z.B. durch Antikörper zu hemmen, um so eine unkontrollierte Ausbreitung des Erregers durch koordiniert ablaufende Immunreaktionen zu verhindern.

Es konnte gezeigt werden, dass IL-37 mit seinen zahlreichen anti-inflammatorischen und immunmodulatorischen Effekten bei einer Vielzahl von entzündlichen Prozessen und Autoimmunkrankheiten einen positiven Einfluss hat und die Schwere des Krankheitsverlaufes nachhaltig mildert. Studien mit IL-37tg-Mäusen und WT-Mäusen, die mit rekombinanten IL-37 behandelt wurden sowie Untersuchungen von humanem Patientenmaterial, verdeutlichen dies. So dämpft IL-37 unter anderem das entzündliche Geschehen bei der Schuppenflechte (Psoriasis), der rheumatoiden Arthritis sowie dem systemischen Lupus erythematoses nachweislich ein (Teng et al. 2014, Ye et al. 2015a, Ye et al. 2014a). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-37 das Krankheitsgeschehen bei Vorliegen einer hepatischen Ischämie, einem metabolischen Syndrom und einer Colitis abmildert (McNamee et al. 2011, Sakai et al. 2012, Ballak et al. 2014). Auch auf das Geschehen nach einer Rückenmarkverletzung und einem Herzinfarkt sowie bei Asthma und Arteriosklerose übt IL-37 eine positive Funktion aus (Lunding et al. 2015, Xu et al. 2015, Wu et al. 2013, Coll-Miro et al. 2016).

Auch wenn ein Vergleich mit dem menschlichen Organismus nur bedingt möglich ist, weisen die in dieser Arbeit generierten Ergebnisse darauf hin, dass durch IL-37 ein erhöhtes Risiko besteht, an einer invasiven Pneumokokken-Infektion zu erkranken, was zumindest teilweise auf die Präsenz von IL-37 zurückzuführen sein könnte. Klinisch gesehen wäre eine Impfung gegen Pneumokokken ratsam, um dieses Risiko zu verringern.

Da ungeklärt bleibt, in welche Signalwege der Immunantwort IL-37 während einer Pneumokokken-Pneumonie involviert ist, sind weitere Studien notwendig, um die Wirkung dieses Zytokins besser beurteilen zu können.

9 Literatur- und Quellenverzeichnis

- Abbate A, Canada JM, Van Tassell BW, Wise CM, Dinarello CA. 2014. Interleukin-1 blockade in rheumatoid arthritis and heart failure: a missed opportunity? *Int J Cardiol*, 171 (3):e125-126.
- Al Shahi H, Shimada K, Miyauchi K, Yoshihara T, Sai E, Shiozawa T, Naito R, Aikawa T, Ouchi S, Kadoguchi T, Miyazaki T, Daida H. 2015. Elevated Circulating Levels of Inflammatory Markers in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Int J Vasc Med*, 2015:805375.
- AlonsoDeVelasco E, Verheul AF, Verhoef J, Snippe H. 1995. Streptococcus pneumoniae: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev*, 59 (4):591-603.
- Asokanathan N, Graham PT, Fink J, Knight DA, Bakker AJ, McWilliam AS, Thompson PJ, Stewart GA. 2002. Activation of protease-activated receptor (PAR)-1, PAR-2, and PAR-4 stimulates IL-6, IL-8, and prostaglandin E2 release from human respiratory epithelial cells. *J Immunol*, 168 (7):3577-3585.
- Attisano L, Wrana JL. 1998. Mads and Smads in TGF beta signalling. *Curr Opin Cell Biol*, 10 (2):188-194.
- Attisano L, Wrana JL. 2002. Signal transduction by the TGF-beta superfamily. *Science*, 296 (5573):1646-1647.
- Austrian R. 1986. Some aspects of the pneumococcal carrier state. *J Antimicrob Chemother*, 18 Suppl A:35-45.
- Ballak DB, van Diepen JA, Moschen AR, Jansen HJ, Hijmans A, Groenhof GJ, Leenders F, Bufler P, Boekschoten MV, Muller M, Kersten S, Li S, Kim S, Eini H, Lewis EC, Joosten LA, Tilg H, Netea MG, Tack CJ, Dinarello CA, Stienstra R. 2014. IL-37 protects against obesity-induced inflammation and insulin resistance. *Nat Commun*, 5:4711.
- Bals R, Hiemstra PS. 2004. Innate immunity in the lung: how epithelial cells fight against respiratory pathogens. *Eur Respir J*, 23 (2):327-333.
- Benner EJ, Munzinger JP, Chan R. 1974. Superinfections of the lung. An evaluation by serial transtracheal aspirations. *West J Med*, 121 (3):173-178.
- Bogaert D, De Groot R, Hermans PW. 2004. Streptococcus pneumoniae colonisation: the key to pneumococcal disease. *Lancet Infect Dis*, 4 (3):144-154.
- Bohrer H, Qiu F, Zimmermann T, Zhang Y, Jllmer T, Mannel D, Bottiger BW, Stern DM, Waldherr R, Saeger HD, Ziegler R, Bierhaus A, Martin E, Nawroth PP. 1997. Role of NFkappaB in the mortality of sepsis. *J Clin Invest*, 100 (5):972-985.
- Boraschi D, Lucchesi D, Hainzl S, Leitner M, Maier E, Mangelberger D, Oostingh GJ, Pfaller T, Pixner C, Posselt G, Italiani P, Nold MF, Nold-Petry CA, Bufler P, Dinarello CA. 2011. IL-37: a new anti-inflammatory cytokine of the IL-1 family. *Eur Cytokine Netw*, 22 (3):127-147.
- Borrello S, Nicolo C, Delogu G, Pandolfi F, Ria F. 2011. TLR2: a crossroads between infections and autoimmunity? *Int J Immunopathol Pharmacol*, 24 (3):549-556.
- Boshart M, Weber F, Jahn G, Dorsch-Hasler K, Fleckenstein B, Schaffner W. 1985. A very strong enhancer is located upstream of an immediate early gene of human cytomegalovirus. *Cell*, 41 (2):521-530.
- Bouali E, Kaabachi W, Hamzaoui A, Hamzaoui K. 2015. Interleukin-37 expression is decreased in Behcet's disease and is associated with inflammation. *Immunol Lett*, 167 (2):87-94.
- Boulnois GJ. 1992. Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by Streptococcus pneumoniae. *J Gen Microbiol*, 138 (2):249-259.

- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer M, Senear AW, Warren R, Palmiter RD. 1981. Somatic expression of herpes thymidine kinase in mice following injection of a fusion gene into eggs. *Cell*, 27 (1 Pt 2):223-231.
- Bufler P, Gamboni-Robertson F, Azam T, Kim SH, Dinarello CA. 2004. Interleukin-1 homologues IL-1F7b and IL-18 contain functional mRNA instability elements within the coding region responsive to lipopolysaccharide. *Biochem J*, 381 (Pt 2):503-510.
- Bufler P, Azam T, Gamboni-Robertson F, Reznikov LL, Kumar S, Dinarello CA, Kim SH. 2002. A complex of the IL-1 homologue IL-1F7b and IL-18-binding protein reduces IL-18 activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99 (21):13723-13728.
- Bulau AM, Nold MF, Li S, Nold-Petry CA, Fink M, Mansell A, Schwerd T, Hong J, Rubartelli A, Dinarello CA, Bufler P. 2014. Role of caspase-1 in nuclear translocation of IL-37, release of the cytokine, and IL-37 inhibition of innate immune responses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111 (7):2650-2655.
- Busfield SJ, Comrack CA, Yu G, Chickering TW, Smutko JS, Zhou H, Leiby KR, Holmgren LM, Gearing DP, Pan Y. 2000. Identification and gene organization of three novel members of the IL-1 family on human chromosome 2. *Genomics*, 66 (2):213-216.
- Calbo E, Garau J. 2010. Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*, 35 (2):107-113.
- Cartwright K. 2002. Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr*, 161 (4):188-195.
- Chai M, Zhang HT, Zhou YJ, Ji QW, Yang Q, Liu YY, Zhao YX, Shi DM, Liu W, Yang LX, Zhang LL, Liang J. 2017. Elevated IL-37 levels in the plasma of patients with severe coronary artery calcification. *J Geriatr Cardiol*, 14 (5):285-291.
- Chai M, Ji Q, Zhang H, Zhou Y, Yang Q, Zhou Y, Guo G, Liu W, Han W, Yang L, Zhang L, Liang J, Liu Y, Shi D, Zhao Y. 2015. The Protective Effect of Interleukin-37 on Vascular Calcification and Atherosclerosis in Apolipoprotein E-Deficient Mice with Diabetes. *J Interferon Cytokine Res*, 35 (7):530-539.
- Charrad R, Berraies A, Hamdi B, Ammar J, Hamzaoui K, Hamzaoui A. 2016. Anti-inflammatory activity of IL-37 in asthmatic children: Correlation with inflammatory cytokines TNF-alpha, IL-beta, IL-6 and IL-17A. *Immunobiology*, 221 (2):182-187.
- Cheng J, Ouyang H, Du J. 2014. Expression and Regulation of Interleukin-37 in Pathogenesis of Nasal Polyps. *Indian J Otolaryngol Head Neck Surg*, 66 (4):401-406.
- Cho A, Haruyama N, Kulkarni AB. 2009. Generation of transgenic mice. *Curr Protoc Cell Biol*, Chapter 19:Unit 19 11.
- Coll-Miro M, Francos-Quijorna I, Santos-Nogueira E, Torres-Espin A, Bufler P, Dinarello CA, Lopez-Vales R. 2016. Beneficial effects of IL-37 after spinal cord injury in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113 (5):1411-1416.
- Costa DB, Shin B, Cooper DL. 2004. Pneumococemia as the presenting feature of multiple myeloma. *Am J Hematol*, 77 (3):277-281.
- Costantini F, Lacy E. 1981. Introduction of a rabbit beta-globin gene into the mouse germ line. *Nature*, 294 (5836):92-94.
- Craig A, Mai J, Cai S, Jeyaseelan S. 2009. Neutrophil recruitment to the lungs during bacterial pneumonia. *Infect Immun*, 77 (2):568-575.

- Dallaire F, Ouellet N, Bergeron Y, Turmel V, Gauthier MC, Simard M, Bergeron MG. 2001. Microbiological and inflammatory factors associated with the development of pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*, 184 (3):292-300.
- de Bruyn G, Whelan TP, Mulligan MS, Raghu G, Limaye AP. 2004. Invasive pneumococcal infections in adult lung transplant recipients. *Am J Transplant*, 4 (8):1366-1371.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut JF, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent JL, International Surviving Sepsis Campaign Guidelines C, American Association of Critical-Care N, American College of Chest P, American College of Emergency P, Canadian Critical Care S, European Society of Clinical M, Infectious D, European Society of Intensive Care M, European Respiratory S, International Sepsis F, Japanese Association for Acute M, Japanese Society of Intensive Care M, Society of Critical Care M, Society of Hospital M, Surgical Infection S, World Federation of Societies of I, Critical Care M. 2008. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*, 36 (1):296-327.
- Di Stefano A, Caramori G, Barczyk A, Vicari C, Brun P, Zanini A, Cappello F, Garofano E, Padovani A, Contoli M, Casolari P, Durham AL, Chung KF, Barnes PJ, Papi A, Adcock I, Balbi B. 2014. Innate immunity but not NLRP3 inflammasome activation correlates with severity of stable COPD. *Thorax*, 69 (6):516-524.
- Dinarello CA. 2005. Blocking IL-1 in systemic inflammation. *J Exp Med*, 201 (9):1355-1359.
- Dinarello CA. 2013. Overview of the interleukin-1 family of ligands and receptors. *Semin Immunol*, 25 (6):389-393.
- Dinarello CA, Nold-Petry C, Nold M, Fujita M, Li S, Kim S, Bufler P. 2016. Suppression of innate inflammation and immunity by interleukin-37. *Eur J Immunol*, 46 (5):1067-1081.
- Dockrell DH, Whyte MK, Mitchell TJ. 2012. Pneumococcal pneumonia: mechanisms of infection and resolution. *Chest*, 142 (2):482-491.
- Dockrell DH, Marriott HM, Prince LR, Ridger VC, Ince PG, Hellewell PG, Whyte MK. 2003. Alveolar macrophage apoptosis contributes to pneumococcal clearance in a resolving model of pulmonary infection. *J Immunol*, 171 (10):5380-5388.
- Ekdahl K, Ahlinder I, Hansson HB, Melander E, Molstad S, Soderstrom M, Persson K. 1997. Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin Infect Dis*, 25 (5):1113-1117.
- Ewig S, Welte T, Chastre J, Torres A. 2010. Rethinking the concepts of community-acquired and health-care-associated pneumonia. *Lancet Infect Dis*, 10 (4):279-287.
- Fan J, Frey RS, Malik AB. 2003. TLR4 signaling induces TLR2 expression in endothelial cells via neutrophil NADPH oxidase. *J Clin Invest*, 112 (8):1234-1243.
- Fatykhova D, Rabes A, Machnik C, Guruprasad K, Pache F, Berg J, Toennies M, Bauer TT, Schneider P, Schimek M, Eggeling S, Mitchell TJ, Mitchell AM, Hilker R, Hain T, Suttrop N, Hippenstiel S, Hocke AC, Opitz B. 2015. Serotype 1 and 8 *Pneumococci* Evade Sensing by Inflammasomes in Human Lung Tissue. *PLoS One*, 10 (8):e0137108.

- Foecking MK, Hofstetter H. 1986. Powerful and versatile enhancer-promoter unit for mammalian expression vectors. *Gene*, 45 (1):101-105.
- Force ADT, Ranieri VM, Rubenfeld GD, Thompson BT, Ferguson ND, Caldwell E, Fan E, Camporota L, Slutsky AS. 2012. Acute respiratory distress syndrome: the Berlin Definition. *JAMA*, 307 (23):2526-2533.
- Formigli L, Papucci L, Tani A, Schiavone N, Tempestini A, Orlandini GE, Capaccioli S, Orlandini SZ. 2000. Aponecrosis: morphological and biochemical exploration of a syncretic process of cell death sharing apoptosis and necrosis. *J Cell Physiol*, 182 (1):41-49.
- Fujita H, Inoue Y, Seto K, Komitsu N, Aihara M. 2013. Interleukin-37 is elevated in subjects with atopic dermatitis. *J Dermatol Sci*, 69 (2):173-175.
- Garenne M, Ronsmans C, Campbell H. 1992. The magnitude of mortality from acute respiratory infections in children under 5 years in developing countries. *World Health Stat Q*, 45 (2-3):180-191.
- Ge G, Wang A, Yang J, Chen Y, Yang J, Li Y, Xue Y. 2016. Interleukin-37 suppresses tumor growth through inhibition of angiogenesis in non-small cell lung cancer. *J Exp Clin Cancer Res*, 35:13.
- Ge R, Pan F, Liao F, Xia G, Mei Y, Shen B, Zhang T, Gao J, Zhang L, Duan Z, Xu S, Xu J. 2011. Analysis on the interaction between IL-1F7 gene and environmental factors on patients with ankylosing spondylitis: a case-only study. *Mol Biol Rep*, 38 (4):2281-2284.
- Geno KA, Gilbert GL, Song JY, Skovsted IC, Klugman KP, Jones C, Konradsen HB, Nahm MH. 2015. Pneumococcal Capsules and Their Types: Past, Present, and Future. *Clin Microbiol Rev*, 28 (3):871-899.
- Ghazal P, Lubon H, Fleckenstein B, Hennighausen L. 1987. Binding of transcription factors and creation of a large nucleoprotein complex on the human cytomegalovirus enhancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84 (11):3658-3662.
- Gomez MI, Prince A. 2008. Airway epithelial cell signaling in response to bacterial pathogens. *Pediatr Pulmonol*, 43 (1):11-19.
- Gong J, Wei T, Stark RW, Jamitzky F, Heckl WM, Anders HJ, Lech M, Rossle SC. 2010. Inhibition of Toll-like receptors TLR4 and 7 signaling pathways by SIGIRR: a computational approach. *J Struct Biol*, 169 (3):323-330.
- Gordon JW, Ruddle FH. 1981. Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science*, 214 (4526):1244-1246.
- Greene CM, McElvaney NG. 2005. Toll-like receptor expression and function in airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 53 (5):418-427.
- Grimsby S, Jaensson H, Dubrovskaya A, Lomnytska M, Hellman U, Souchelnytskyi S. 2004. Proteomics-based identification of proteins interacting with Smad3: SREBP-2 forms a complex with Smad3 and inhibits its transcriptional activity. *FEBS Lett*, 577 (1-2):93-100.
- Gunaltay S, Nyhlin N, Kumawat AK, Tysk C, Bohr J, Hultgren O, Hultgren Hornquist E. 2014. Differential expression of interleukin-1/Toll-like receptor signaling regulators in microscopic and ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*, 20 (34):12249-12259.
- Hagel S, Pletz MW, Brunkhorst FM, Seifert H, Kern WV. 2013. [Bacteremia and sepsis]. *Internist (Berl)*, 54 (4):399-407.

- Hammerschmidt S, Wolff S, Hocke A, Rosseau S, Muller E, Rohde M. 2005. Illustration of pneumococcal polysaccharide capsule during adherence and invasion of epithelial cells. *Infect Immun*, 73 (8):4653-4667.
- Heldin CH, Miyazono K, ten Dijke P. 1997. TGF-beta signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature*, 390 (6659):465-471.
- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S. 2000. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature*, 408 (6813):740-745.
- Henriques-Normark B, Tuomanen EI. 2013. The pneumococcus: epidemiology, microbiology, and pathogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 3 (7).
- Herbert Hof, Rüdiger Dörries:Medizinische Mikrobiologie. 3. Auflage.Thieme, 2005, ISBN 3-13-125313-4.
- Herbold W, Maus R, Hahn I, Ding N, Srivastava M, Christman JW, Mack M, Reutershan J, Briles DE, Paton JC, Winter C, Welte T, Maus UA. 2010. Importance of CXC chemokine receptor 2 in alveolar neutrophil and exudate macrophage recruitment in response to pneumococcal lung infection. *Infect Immun*, 78 (6):2620-2630.
- Hippenstiel S, Opitz B, Schmeck B, Suttorp N. 2006. Lung epithelium as a sentinel and effector system in pneumonia--molecular mechanisms of pathogen recognition and signal transduction. *Respir Res*, 7:97.
- Hojen JF, Rasmussen TA, Andersen KL, Winckelmann AA, Laursen RR, Gunst JD, Moller HJ, Fujita M, Ostergaard L, Sogaard OS, Dinarello CA, Tolstrup M. 2015. Interleukin-37 Expression Is Increased in Chronic HIV-1-Infected Individuals and Is Associated with Inflammation and the Size of the Total Viral Reservoir. *Mol Med*, 21:337-345.
- Hotchkiss RS, Karl IE. 2003. The pathophysiology and treatment of sepsis. *N Engl J Med*, 348 (2):138-150.
- Hotchkiss RS, Tinsley KW, Swanson PE, Karl IE. 2002. Endothelial cell apoptosis in sepsis. *Crit Care Med*, 30 (5 Suppl):S225-228.
- Huang Z, Gao C, Chi X, Hu YW, Zheng L, Zeng T, Wang Q. 2015. IL-37 Expression is Upregulated in Patients with Tuberculosis and Induces Macrophages Towards an M2-like Phenotype. *Scand J Immunol*, 82 (4):370-379.
- Imaeda H, Takahashi K, Fujimoto T, Kasumi E, Ban H, Bamba S, Sonoda H, Shimizu T, Fujiyama Y, Andoh A. 2013. Epithelial expression of interleukin-37b in inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol*, 172 (3):410-416.
- Jaenisch R, Mintz B. 1974. Simian virus 40 DNA sequences in DNA of healthy adult mice derived from preimplantation blastocysts injected with viral DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71 (4):1250-1254.
- Jartti T, Palomares O, Waris M, Tastan O, Nieminen R, Puhakka T, Ruckert B, Aab A, Vuorinen T, Allander T, Vahlberg T, Ruuskanen O, Akdis M, Akdis CA. 2014. Distinct regulation of tonsillar immune response in virus infection. *Allergy*, 69 (5):658-667.
- Jones SA. 2005. Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6. *J Immunol*, 175 (6):3463-3468.
- Kadioglu A, Weiser JN, Paton JC, Andrew PW. 2008. The role of *Streptococcus pneumoniae* virulence factors in host respiratory colonization and disease. *Nat Rev Microbiol*, 6 (4):288-301.

- Kato A, Schleimer RP. 2007. Beyond inflammation: airway epithelial cells are at the interface of innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 19 (6):711-720.
- Kaufmann A, Muhlradt PF, Gerns D, Sprenger H. 1999. Induction of cytokines and chemokines in human monocytes by *Mycoplasma fermentans*-derived lipoprotein MALP-2. *Infect Immun*, 67 (12):6303-6308.
- Kawai T, Akira S. 2010. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol*, 11 (5):373-384.
- Keller M, Ruegg A, Werner S, Beer HD. 2008. Active caspase-1 is a regulator of unconventional protein secretion. *Cell*, 132 (5):818-831.
- Knapp S, Leemans JC, Florquin S, Branger J, Maris NA, Pater J, van Rooijen N, van der Poll T. 2003. Alveolar macrophages have a protective antiinflammatory role during murine pneumococcal pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med*, 167 (2):171-179.
- Koppe U, Suttorp N, Opitz B. 2012. Recognition of *Streptococcus pneumoniae* by the innate immune system. *Cell Microbiol*, 14 (4):460-466.
- Kukavica-Ibrulj I, Hamelin ME, Prince GA, Gagnon C, Bergeron Y, Bergeron MG, Boivin G. 2009. Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia. *J Virol*, 83 (3):1341-1349.
- Kumar S, McDonnell PC, Lehr R, Tierney L, Tzimas MN, Griswold DE, Capper EA, Tal-Singer R, Wells GI, Doyle ML, Young PR. 2000. Identification and initial characterization of four novel members of the interleukin-1 family. *J Biol Chem*, 275 (14):10308-10314.
- Kumar S, Hanning CR, Brigham-Burke MR, Rieman DJ, Lehr R, Khandekar S, Kirkpatrick RB, Scott GF, Lee JC, Lynch FJ, Gao W, Gambotto A, Lotze MT. 2002. Interleukin-1F7B (IL-1H4/IL-1F7) is processed by caspase-1 and mature IL-1F7B binds to the IL-18 receptor but does not induce IFN-gamma production. *Cytokine*, 18 (2):61-71.
- Laterre PF, Garber G, Levy H, Wunderink R, Kinasevitz GT, Sollet JP, Maki DG, Bates B, Yan SC, Dhainaut JF, Committee PCE. 2005. Severe community-acquired pneumonia as a cause of severe sepsis: data from the PROWESS study. *Crit Care Med*, 33 (5):952-961.
- Lee CJ, Banks SD, Li JP. 1991. Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev Microbiol*, 18 (2):89-114.
- Li C, Zhao P, Sun X, Che Y, Jiang Y. 2013a. Elevated levels of cerebrospinal fluid and plasma interleukin-37 in patients with Guillain-Barre syndrome. *Mediators Inflamm*, 2013:639712.
- Li C, Ji H, Cai Y, Ayana DA, Lv P, Liu M, Jiang Y. 2013b. Serum interleukin-37 concentrations and HBeAg seroconversion in chronic HBV patients during telbivudine treatment. *J Interferon Cytokine Res*, 33 (10):612-618.
- Li J, Ma Z, Tang ZL, Stevens T, Pitt B, Li S. 2004. CpG DNA-mediated immune response in pulmonary endothelial cells. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 287 (3):L552-558.
- Li S, Neff CP, Barber K, Hong J, Luo Y, Azam T, Palmer BE, Fujita M, Garlanda C, Mantovani A, Kim S, Dinarello CA. 2015. Extracellular forms of IL-37 inhibit innate inflammation in vitro and in vivo but require the IL-1 family decoy receptor IL-1R8. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112 (8):2497-2502.
- Li Y, Wang Z, Yu T, Chen B, Zhang J, Huang K, Huang Z. 2014. Increased expression of IL-37 in patients with Graves' disease and its contribution to suppression of

proinflammatory cytokines production in peripheral blood mononuclear cells. *PLoS One*, 9 (9):e107183.

Liu W, Deng L, Chen Y, Sun C, Wang J, Zhou L, Li H, Luo R. 2014. Anti-inflammatory effect of IL-37b in children with allergic rhinitis. *Mediators Inflamm*, 2014:746846.

Loda FA, Collier AM, Glezen WP, Strangert K, Clyde WA, Jr., Denny FW. 1975. Occurrence of *Diplococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of children. *J Pediatr*, 87 (6 Pt 2):1087-1093.

Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, Adair T, Aggarwal R, Ahn SY, Alvarado M, Anderson HR, Anderson LM, Andrews KG, Atkinson C, Baddour LM, Barker-Collo S, Bartels DH, Bell ML, Benjamin EJ, Bennett D, Bhalla K, Bikbov B, Bin Abdulhak A, Birbeck G, Blyth F, Bolliger I, Boufous S, Bucello C, Burch M, Burney P, Carapetis J, Chen H, Chou D, Chugh SS, Coffeng LE, Colan SD, Colquhoun S, Colson KE, Condon J, Connor MD, Cooper LT, Corriere M, Cortinovis M, de Vaccaro KC, Couser W, Cowie BC, Criqui MH, Cross M, Dabhadkar KC, Dahodwala N, De Leo D, Degenhardt L, Delossantos A, Denenberg J, Des Jarlais DC, Dharmaratne SD, Dorsey ER, Driscoll T, Duber H, Ebel B, Erwin PJ, Espindola P, Ezzati M, Feigin V, Flaxman AD, Forouzanfar MH, Fowkes FG, Franklin R, Fransen M, Freeman MK, Gabriel SE, Gakidou E, Gaspari F, Gillum RF, Gonzalez-Medina D, Halasa YA, Haring D, Harrison JE, Havmoeller R, Hay RJ, Hoen B, Hotez PJ, Hoy D, Jacobsen KH, James SL, Jasrasaria R, Jayaraman S, Johns N, Karthikeyan G, Kassebaum N, Keren A, Khoo JP, Knowlton LM, Kobusingye O, Koranteng A, Krishnamurthi R, Lipnick M, Lipshultz SE, Ohno SL, Mabweijano J, MacIntyre MF, Mallinger L, March L, Marks GB, Marks R, Matsumori A, Matzopoulos R, Mayosi BM, McAnulty JH, McDermott MM, McGrath J, Mensah GA, Merriman TR, Michaud C, Miller M, Miller TR, Mock C, Mocumbi AO, Mokdad AA, Moran A, Mulholland K, Nair MN, Naldi L, Narayan KM, Nasseri K, Norman P, O'Donnell M, Omer SB, Ortblad K, Osborne R, Ozgediz D, Pahari B, Pandian JD, Rivero AP, Padilla RP, Perez-Ruiz F, Perico N, Phillips D, Pierce K, Pope CA, 3rd, Porrini E, Pourmalek F, Raju M, Ranganathan D, Rehm JT, Rein DB, Remuzzi G, Rivara FP, Roberts T, De Leon FR, Rosenfeld LC, Rushton L, Sacco RL, Salomon JA, Sampson U, Sanman E, Schwebel DC, Segui-Gomez M, Shepard DS, Singh D, Singleton J, Sliwa K, Smith E, Steer A, Taylor JA, Thomas B, Tleyjeh IM, Towbin JA, Truelsen T, Undurraga EA, Venketasubramanian N, Vijayakumar L, Vos T, Wagner GR, Wang M, Wang W, Watt K, Weinstock MA, Weintraub R, Wilkinson JD, Woolf AD, Wulf S, Yeh PH, Yip P, Zabetian A, Zheng ZJ, Lopez AD, Murray CJ, AlMazroa MA, Memish ZA. 2012. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet*, 380 (9859):2095-2128.

Lunding L, Webering S, Vock C, Schroder A, Raedler D, Schaub B, Fehrenbach H, Wegmann M. 2015. IL-37 requires IL-18Ralpha and SIGIRR/IL-1R8 to diminish allergic airway inflammation in mice. *Allergy*, 70 (4):366-373.

Lynch JP, 3rd, Zhanel GG. 2010. *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med*, 16 (3):217-225.

Malley R, Henneke P, Morse SC, Cieslewicz MJ, Lipsitch M, Thompson CM, Kurt-Jones E, Paton JC, Wessels MR, Golenbock DT. 2003. Recognition of pneumolysin by Toll-like receptor 4 confers resistance to pneumococcal infection. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100 (4):1966-1971.

- Maris NA, Dessing MC, de Vos AF, Bresser P, van der Zee JS, Jansen HM, Spek CA, van der Poll T. 2006. Toll-like receptor mRNA levels in alveolar macrophages after inhalation of endotoxin. *Eur Respir J*, 28 (3):622-626.
- Massague J. 1998. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*, 67:753-791.
- Matthay MA, Zemans RL. 2011. The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment. *Annu Rev Pathol*, 6:147-163.
- Matthay MA, Ware LB, Zimmerman GA. 2012. The acute respiratory distress syndrome. *J Clin Invest*, 122 (8):2731-2740.
- Mayer AK, Dalpke AH. 2007. Regulation of local immunity by airway epithelial cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)*, 55 (6):353-362.
- Mayer AK, Muehmer M, Mages J, Gueinzius K, Hess C, Heeg K, Bals R, Lang R, Dalpke AH. 2007. Differential recognition of TLR-dependent microbial ligands in human bronchial epithelial cells. *J Immunol*, 178 (5):3134-3142.
- McCullers JA, English BK, Novak R. 2000. Isolation and characterization of vancomycin-tolerant *Streptococcus pneumoniae* from the cerebrospinal fluid of a patient who developed recrudescence meningitis. *J Infect Dis*, 181 (1):369-373.
- McNamee EN, Masterson JC, Jedlicka P, McManus M, Grenz A, Collins CB, Nold MF, Nold-Petry C, Bufler P, Dinarello CA, Rivera-Nieves J. 2011. Interleukin 37 expression protects mice from colitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108 (40):16711-16716.
- Means TK, Lien E, Yoshimura A, Wang S, Golenbock DT, Fenton MJ. 1999. The CD14 ligands lipoarabinomannan and lipopolysaccharide differ in their requirement for Toll-like receptors. *J Immunol*, 163 (12):6748-6755.
- Mercer PF, Williams AE, Scotton CJ, Jose RJ, Sulikowski M, Moffatt JD, Murray LA, Chambers RC. 2014. Proteinase-activated receptor-1, CCL2, and CCL7 regulate acute neutrophilic lung inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 50 (1):144-157.
- Mizgerd JP. 2008. Acute lower respiratory tract infection. *N Engl J Med*, 358 (7):716-727.
- Moreland JG, Bailey G, Nauseef WM, Weiss JP. 2004. Organism-specific neutrophil-endothelial cell interactions in response to *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Staphylococcus aureus*. *J Immunol*, 172 (1):426-432.
- Moretti S, Bozza S, Oikonomou V, Renga G, Casagrande A, Iannitti RG, Puccetti M, Garlanda C, Kim S, Li S, van de Veerdonk FL, Dinarello CA, Romani L. 2014. IL-37 inhibits inflammasome activation and disease severity in murine aspergillosis. *PLoS Pathog*, 10 (11):e1004462.
- Mosser DM, Edwards JP. 2008. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*, 8 (12):958-969.
- Muhlradt PF, Quentmeier H, Schmitt E. 1991. Involvement of interleukin-1 (IL-1), IL-6, IL-2, and IL-4 in generation of cytolytic T cells from thymocytes stimulated by a *Mycoplasma fermentans*-derived product. *Infect Immun*, 59 (11):3962-3968.
- Muhr P, Zeitvogel J, Heitland I, Werfel T, Wittmann M. 2011. Expression of interleukin (IL)-1 family members upon stimulation with IL-17 differs in keratinocytes derived from patients with psoriasis and healthy donors. *Br J Dermatol*, 165 (1):189-193.
- Musher DM. *Streptococcus pneumoniae*. In: Mandell GL. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 7. Auflage. Churchill Livingstone; 2009;2623-39.
- Naveau C, Houssiau FA. 2005. Pneumococcal sepsis in patients with systemic lupus erythematosus. *Lupus*, 14 (11):903-906.

- Nelson S, Summer WR. 1998. Innate immunity, cytokines, and pulmonary host defense. *Infect Dis Clin North Am*, 12 (3):555-567, vii.
- Nold-Petry CA, Lo CY, Rudloff I, Elgass KD, Li S, Gantier MP, Lotz-Havla AS, Gersting SW, Cho SX, Lao JC, Ellisdon AM, Rotter B, Azam T, Mangan NE, Rossello FJ, Whisstock JC, Bufler P, Garlanda C, Mantovani A, Dinarello CA, Nold MF. 2015. IL-37 requires the receptors IL-18R α and IL-1R8 (SIGIRR) to carry out its multifaceted anti-inflammatory program upon innate signal transduction. *Nat Immunol*, 16 (4):354-365.
- Nold MF, Nold-Petry CA, Zepp JA, Palmer BE, Bufler P, Dinarello CA. 2010. IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity. *Nat Immunol*, 11 (11):1014-1022.
- Nuorti JP, Butler JC, Gelling L, Kool JL, Reingold AL, Vugia DJ. 2000. Epidemiologic relation between HIV and invasive pneumococcal disease in San Francisco County, California. *Ann Intern Med*, 132 (3):182-190.
- Nuorti JP, Butler JC, Crutcher JM, Guevara R, Welch D, Holder P, Elliott JA. 1998. An outbreak of multidrug-resistant pneumococcal pneumonia and bacteremia among unvaccinated nursing home residents. *N Engl J Med*, 338 (26):1861-1868.
- O'Brien KL, Watt JP, Henkle E, Deloria-Knoll M, McCall N, Lee E, Mulholland K, Levine OS, Cherian T. 2009. Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet*, 374:893-902.
- Opitz B, van Laak V, Eitel J, Suttorp N. 2010. Innate immune recognition in infectious and noninfectious diseases of the lung. *Am J Respir Crit Care Med*, 181 (12):1294-1309.
- Pan G, Risser P, Mao W, Baldwin DT, Zhong AW, Filvaroff E, Yansura D, Lewis L, Eigenbrot C, Henzel WJ, Vandlen R. 2001. IL-1H, an interleukin 1-related protein that binds IL-18 receptor/IL-1Rr. *Cytokine*, 13 (1):1-7.
- Paterson GK, Mitchell TJ. 2006. Innate immunity and the pneumococcus. *Microbiology*, 152 (Pt 2):285-293.
- Pfaffl MW. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*, 29 (9):e45.
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. 2002. Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res*, 30 (9):e36.
- Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP. 2004. Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol Lett*, 26 (6):509-515.
- Rahman MM, McFadden G. 2006. Modulation of tumor necrosis factor by microbial pathogens. *PLoS Pathog*, 2 (2):e4.
- Raschke WC, Baird S, Ralph P, Nakoinz I. 1978. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. *Cell*, 15 (1):261-267.
- Rees S, Coote J, Stables J, Goodson S, Harris S, Lee MG. 1996. Bicistronic vector for the creation of stable mammalian cell lines that predisposes all antibiotic-resistant cells to express recombinant protein. *Biotechniques*, 20 (1):102-104, 106, 108-110.
- Rodgers GL, Arguedas A, Cohen R, Dagan R. 2009. Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine*, 27 (29):3802-3810.

- Rubenfeld GD, Herridge MS. 2007. Epidemiology and outcomes of acute lung injury. *Chest*, 131 (2):554-562.
- Saglam M, Koseoglu S, Savran L, Pekbagriyanik T, Saglam G, Sutcu R. 2015. Levels of interleukin-37 in gingival crevicular fluid, saliva, or plasma in periodontal disease. *J Periodontal Res*, 50 (5):614-621.
- Sakai N, Van Sweringen HL, Belizaire RM, Quillin RC, Schuster R, Blanchard J, Burns JM, Tevar AD, Edwards MJ, Lentsch AB. 2012. Interleukin-37 reduces liver inflammatory injury via effects on hepatocytes and non-parenchymal cells. *J Gastroenterol Hepatol*, 27 (10):1609-1616.
- Sandgren A, Albiger B, Orihuela CJ, Tuomanen E, Normark S, Henriques-Normark B. 2005. Virulence in mice of pneumococcal clonal types with known invasive disease potential in humans. *J Infect Dis*, 192 (5):791-800.
- Schrag SJ, Pena C, Fernandez J, Sanchez J, Gomez V, Perez E, Feris JM, Besser RE. 2001. Effect of short-course, high-dose amoxicillin therapy on resistant pneumococcal carriage: a randomized trial. *JAMA*, 286 (1):49-56.
- Seeley EJ, Matthay MA, Wolters PJ. 2012. Inflection points in sepsis biology: from local defense to systemic organ injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 303 (5):L355-363.
- Seki M, Higashiyama Y, Tomono K, Yanagihara K, Ohno H, Kaneko Y, Izumikawa K, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Tashiro T, Kohno S. 2004. Acute infection with influenza virus enhances susceptibility to fatal pneumonia following *Streptococcus pneumoniae* infection in mice with chronic pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol*, 137 (1):35-40.
- Sevarino KA, Felix R, Banks CM, Low MJ, Montminy MR, Mandel G, Goodman RH. 1987. Cell-specific processing of preprosomatostatin in cultured neuroendocrine cells. *J Biol Chem*, 262 (11):4987-4993.
- Sharma S, Kulk N, Nold MF, Graf R, Kim SH, Reinhardt D, Dinarello CA, Bufler P. 2008. The IL-1 family member 7b translocates to the nucleus and down-regulates proinflammatory cytokines. *J Immunol*, 180 (8):5477-5482.
- Shou X, Lin J, Xie C, Wang Y, Sun C. 2017. Plasma IL-37 Elevated in Patients with Chronic Heart Failure and Predicted Major Adverse Cardiac Events: A 1-Year Follow-Up Study. *Dis Markers*, 2017:9134079.
- Singer M, Deutschman CS, Seymour C, et al. 2016. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). *JAMA*, 315 (8):801-810.
- Smith DE, Renshaw BR, Ketchum RR, Kubin M, Garka KE, Sims JE. 2000. Four new members expand the interleukin-1 superfamily. *J Biol Chem*, 275 (2):1169-1175.
- Song L, Qiu F, Fan Y, Ding F, Liu H, Shu Q, Liu W, Li X. 2013. Glucocorticoid regulates interleukin-37 in systemic lupus erythematosus. *J Clin Immunol*, 33 (1):111-117.
- Takeuchi O, Akira S. 2010. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell*, 140 (6):805-820.
- Tan TQ. 2003. Antibiotic resistant infections due to *Streptococcus pneumoniae*: impact on therapeutic options and clinical outcome. *Curr Opin Infect Dis*, 16 (3):271-277.
- Teng X, Hu Z, Wei X, Wang Z, Guan T, Liu N, Liu X, Ye N, Deng G, Luo C, Huang N, Sun C, Xu M, Zhou X, Deng H, Edwards CK, 3rd, Chen X, Wang X, Cui K, Wei Y, Li J. 2014. IL-37 ameliorates the inflammatory process in psoriasis by suppressing proinflammatory cytokine production. *J Immunol*, 192 (4):1815-1823.

- Thompson SR. 2012. Tricks an IRES uses to enslave ribosomes. *Trends Microbiol*, 20 (11):558-566.
- Thomsen DR, Stenberg RM, Goins WF, Stinski MF. 1984. Promoter-regulatory region of the major immediate early gene of human cytomegalovirus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 81 (3):659-663.
- Tuomanen EI, Austrian R, Masure HR. 1995. Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med*, 332 (19):1280-1284.
- van de Veerdonk FL, Gresnigt MS, Oosting M, van der Meer JW, Joosten LA, Netea MG, Dinarello CA. 2014. Protective host defense against disseminated candidiasis is impaired in mice expressing human interleukin-37. *Front Microbiol*, 5:762.
- van der Poll T, Opal SM. 2009. Pathogenesis, treatment, and prevention of pneumococcal pneumonia. *Lancet*, 374 (9700):1543-1556.
- van der Poll T, Marchant A, Keogh CV, Goldman M, Lowry SF. 1996. Interleukin-10 impairs host defense in murine pneumococcal pneumonia. *J Infect Dis*, 174 (5):994-1000.
- Vernatter J, Pirofski LA. 2013. Current concepts in host-microbe interaction leading to pneumococcal pneumonia. *Curr Opin Infect Dis*, 26 (3):277-283.
- Wang X, Cai X, Chen L, Xu D, Li J. 2015. The evaluation of plasma and leukocytic IL-37 expression in early inflammation in patients with acute ST-segment elevation myocardial infarction after PCI. *Mediators Inflamm*, 2015:626934.
- Watson DA, Musher DM. 1990. Interruption of capsule production in *Streptococcus pneumoniae* serotype 3 by insertion of transposon Tn916. *Infect Immun*, 58 (9):3135-3138.
- Weidlich S, Bulau AM, Schwerdt T, Althans J, Kappler R, Koletzko S, Mayr D, Bufler P. 2014. Intestinal expression of the anti-inflammatory interleukin-1 homologue IL-37 in pediatric inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*, 59 (2):e18-26.
- Welte T. 2009. [Community-acquired pneumonia]. *Internist (Berl)*, 50 (3):331-339; quiz 340.
- Whitman M. 1998. Smads and early developmental signaling by the TGFbeta superfamily. *Genes Dev*, 12 (16):2445-2462.
- WHO (World Health Organisation). (2007) Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - World Health Organization position paper. *Weekly epidemiological report* 82: 93-104.
- WHO (World Health Organisation). (2005). State of the art of vaccine research and development. Initiative for Vaccine Research.
- Winning J, Claus RA, Huse K, Bauer M. 2006. Molecular biology on the ICU. From understanding to treating sepsis. *Minerva Anesthesiol*, 72 (5):255-267.
- Witzenrath M, Gutbier B, Hocke AC, Schmeck B, Hippenstiel S, Berger K, Mitchell TJ, de los Toyos JR, Rosseau S, Suttorp N, Schutte H. 2006. Role of pneumolysin for the development of acute lung injury in pneumococcal pneumonia. *Crit Care Med*, 34 (7):1947-1954.
- Witzenrath M, Pache F, Lorenz D, Koppe U, Gutbier B, Tabeling C, Reppe K, Meixenberger K, Dorhoi A, Ma J, Holmes A, Trendelenburg G, Heimesaat MM, Bereswill S, van der Linden M, Tschopp J, Mitchell TJ, Suttorp N, Opitz B. 2011. The NLRP3 inflammasome is differentially activated by pneumolysin variants and

- contributes to host defense in pneumococcal pneumonia. *J Immunol*, 187 (1):434-440.
- Wrana JL. 2000. Crossing Smads. *Sci STKE*, 2000 (23):re1.
- Wu BW, Zeng QT, Meng K, Ji QW. 2013. The potential role of IL-37 in atherosclerosis. *Pharmazie*, 68 (11):857-860.
- Xia T, Zheng XF, Qian BH, Fang H, Wang JJ, Zhang LL, Pang YF, Zhang J, Wei XQ, Xia ZF, Zhao DB. 2015. Plasma Interleukin-37 Is Elevated in Patients with Rheumatoid Arthritis: Its Correlation with Disease Activity and Th1/Th2/Th17-Related Cytokines. *Dis Markers*, 2015:795043.
- Xu D, Wang A, Jiang F, Hu J, Zhang X. 2015. Effects of interleukin-37 on cardiac function after myocardial infarction in mice. *Int J Clin Exp Pathol*, 8 (5):5247-5251.
- Yang L, Zhang J, Tao J, Lu T. 2015. Elevated serum levels of Interleukin-37 are associated with inflammatory cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis. *APMIS*, 123 (12):1025-1031.
- Ye L, Jiang B, Deng J, Du J, Xiong W, Guan Y, Wen Z, Huang K, Huang Z. 2015a. IL-37 Alleviates Rheumatoid Arthritis by Suppressing IL-17 and IL-17-Triggering Cytokine Production and Limiting Th17 Cell Proliferation. *J Immunol*, 194 (11):5110-5119.
- Ye L, Ji L, Wen Z, Zhou Y, Hu D, Li Y, Yu T, Chen B, Zhang J, Ding L, Du J, Huang Z. 2014a. IL-37 inhibits the production of inflammatory cytokines in peripheral blood mononuclear cells of patients with systemic lupus erythematosus: its correlation with disease activity. *J Transl Med*, 12:69.
- Ye Z, Wang C, Kijlstra A, Zhou X, Yang P. 2014b. A possible role for interleukin 37 in the pathogenesis of Behcet's disease. *Curr Mol Med*, 14 (4):535-542.
- Ye Z, Wang C, Tang J, Zhou Y, Bai L, Liu Y, Kijlstra A, Yang P. 2015b. Decreased interleukin-37 expression in Vogt-Koyanagi-Harada disease and upregulation following immunosuppressive treatment. *J Interferon Cytokine Res*, 35 (4):265-272.
- Yoshimura A, Lien E, Ingalls RR, Tuomanen E, Dziarski R, Golenbock D. 1999. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacterial cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol*, 163 (1):1-5.
- Zeng Q, Song R, Fullerton DA, Ao L, Zhai Y, Li S, Ballak DB, Cleveland JC, Jr., Reece TB, McKinsey TA, Xu D, Dinarello CA, Meng X. 2017. Interleukin-37 suppresses the osteogenic responses of human aortic valve interstitial cells in vitro and alleviates valve lesions in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114 (7):1631-1636.
- Zhao JJ, Pan QZ, Pan K, Weng DS, Wang QJ, Li JJ, Lv L, Wang DD, Zheng HX, Jiang SS, Zhang XF, Xia JC. 2014a. Interleukin-37 mediates the antitumor activity in hepatocellular carcinoma: role for CD57+ NK cells. *Sci Rep*, 4:5177.
- Zhao M, Hu Y, Shou J, Su SB, Yang J, Yang T. 2017. IL-37 impairs host resistance to *Listeria* infection by suppressing macrophage function. *Biochem Biophys Res Commun*, 485 (2):563-568.
- Zhao PW, Jiang WG, Wang L, Jiang ZY, Shan YX, Jiang YF. 2014b. Plasma levels of IL-37 and correlation with TNF- α , IL-17A, and disease activity during DMARD treatment of rheumatoid arthritis. *PLoS One*, 9 (5):e95346.
- Zuker M. 2003. Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res*, 31 (13):3406-3415.

10 Anhang

10.1 *Score-Sheet* zur Beurteilung des Krankheitsverlaufes der Versuchstiere

Tiernummer: Versuchsbeginn:		Datum/Uhrzeit	
Tag seit Versuchsbeginn:			
		Morgens	Abends
Symptome	Score		
Keine Symptome	0		
Provozierte Reaktion			
Flucht beim Öffnen des Käfigs	0		
Flucht bei sich nähernder Hand	1		
Flucht erst beim Anfassen	2		
Keinerlei Fluchtreaktion	3		
Aussehen			
Normales, glattes Fell	0		
Struppiges Fell	1		
Nasses Fell	2		
Blässe (Augen, Ohren), bleibende Hautfalten, Leib hart oder gespannt	2		
Schleimige Augen, Leib hart und aufgetrieben	3		
Atmung			
Normal	0		
Schnell	1		
Langsam	2		
Atemnot (schwerfällig, unregelmäßig, stark pumpend)	3		
Verhalten			
Normal agil, neugierig	0		
Langsam, v.a. sitzende Position, Tier isoliert sich	1		

Matt, gekrümmt (Schmerzen), Gang schwankend	2		
Seitenlage	3		
Gewicht			
-5%	0		
-10%, ungewöhnliche Zunahme	1		
-15%	2		
-20%	3		
Rektaltemperatur			
- 1,0 °C	0		
- 1,5-2,0 °C	1		
- 2,5 – 3,5 C	2		
- > 4/5 °C	3		
<u>Körpermasse/ -temperatur Bestimmung</u>	[g]/ [°C]		

10.2 Repräsentative Bilder der Diff-Quik-Färbung

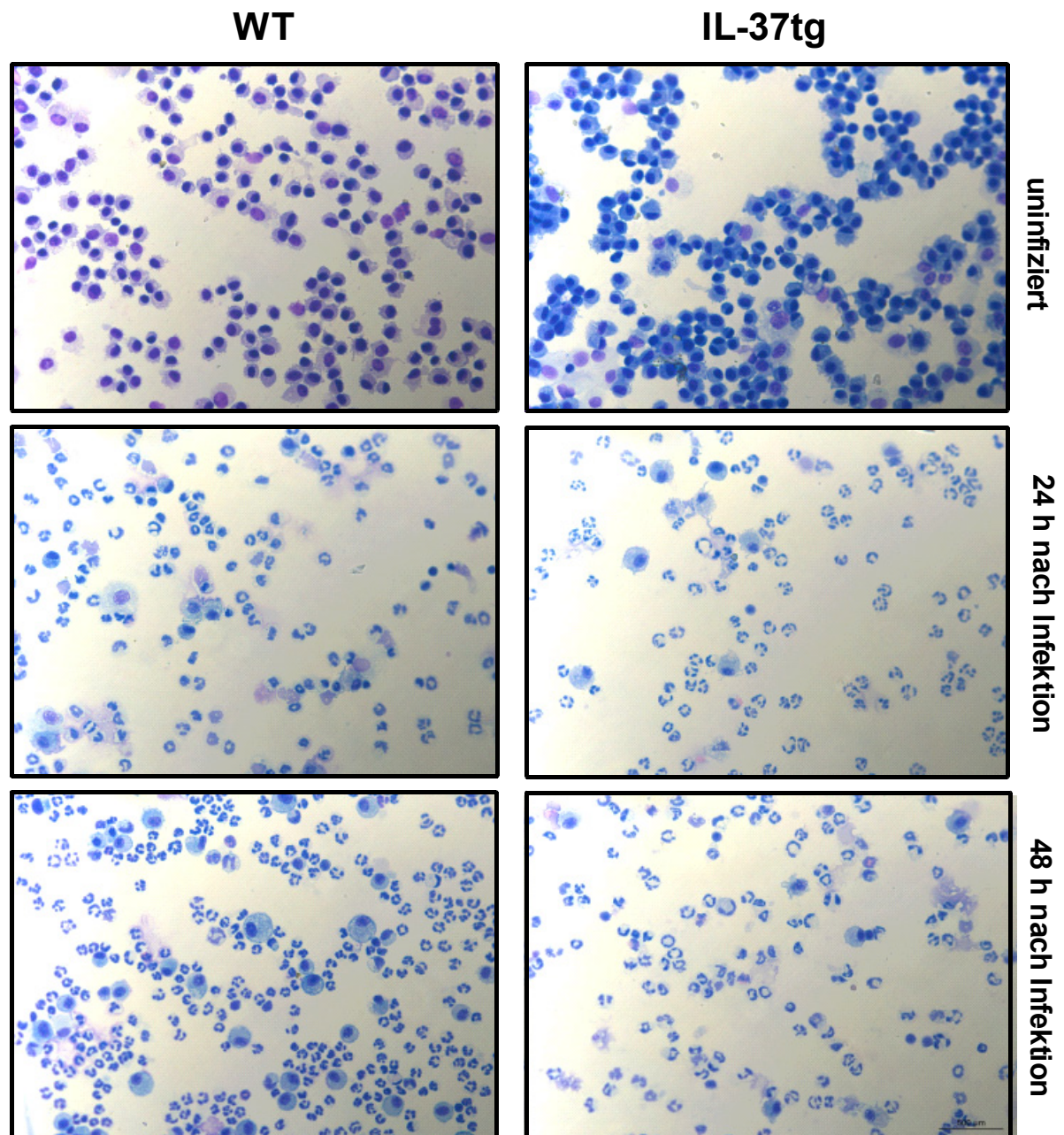


Abbildung 20: Repräsentative Bilder der Diff-Quik-Färbung von Alveolarmakrophagen und neutrophilen Granulozyten aus der BAL, aufgenommen mittels Hellfeld-Mikroskopie und 40-facher Vergrößerung.

10.3 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. Hortense Slevogt, die dieses Projekt zur Verfügung gestellt und mir so ermöglicht hat, diese Arbeit zu erstellen. Sie stand mir mit fachlichen Anregungen stets zur Seite und hat auch in schwierigen Phasen immer hinter dem Projekt

und hinter mir gestanden. Ich bedanke mich auch ganz herzlich bei Frau PD Dr. Kerstin Voigt, die so freundlich war, die Zweitbetreuung meiner Arbeit zu übernehmen.

Weiterhin bedanke ich mich bei der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Gruber (Institut für Tierpathologie; Freie Universität Berlin), insbesondere bei Dr. Kristina Dietert, die die immunhistologische Färbung sowie histopathologische Auswertung der Lungenschnitte durchgeführt hat.

Ich möchte mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und Geduld bei fachlichen Fragen und etablieren von Experimenten bedanken. Mein besonderer Dank gilt hier Carolin von Lachner, die mich in die Techniken der Mausversuche geduldig eingearbeitet hat, obwohl sie selber einen straffen Zeitplan hatte. Auch Dr. Diana Riebold gilt mein Dank. Sie hat mir oft bei langen Tagen helfend zur Seite gestanden und mich mit ihren aufmunternden Gesprächen wach gehalten.

Ich bedanke mich bei Dr. Tilman E. Klassert, der alle Fragen zur Molekularbiologie und Statistik mit mir besprochen hat. Maximilian Julius Lautenbach und Simone Tänzer danke ich für ihre technische Unterstützung. Bei Dr. Diana Riebold und Dr. Esther Klaile bedanke ich mich für das gewissenhafte Korrekturlesen dieser Arbeit.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie. Vor allem meinem Mann gilt hier besonderer Dank. Er baute mich immer wieder auf, wenn es mal nicht so rund lief und hielt mir den Rücken frei, um unsere Kinder zu versorgen, wenn lange Versuchstage anstanden. Auch meinen Eltern möchte ich an dieser Stelle danken, die mir durch die Finanzierung meines Studiums dies hier erst ermöglicht haben.

10.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Hortense Slevogt (Betreuung des

Projekts), Dr. Tilman E. Klassert (Hilfestellung bei der Statistik), Dr. Esther Klaile (Korrekturlesen des Manuskripts), Dr. Diana Riebold (Korrekturlesen des Manuskripts),

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers